Medical Library

DE INVLOED VAN DE VLOEISTOF EENER PROEF-SEPTICTANK OP PATHOGENE DARMBACTERIËN

J. A. F. SCHUT

DE INVLOED VAN DE VLOEISTOF EENER PROEF-SEPTICTANK OP PATHOGENE DARMBACTERIËN

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/deinvloedvandevl0000unse_y9l7

DE INVLOED VAN DE VLOEISTOF EENER PROEF-SEPTICTANK OP PATHOGENE DARMBACTERIËN

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr R. C. BOER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT OP MAANDAG 7 JULI 1924, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR, DOOR

JOHANNES ADRIANUS FRANCISCUS SCHUT - ARTS
GEBOREN TE BOELEKOMBA (ZUID-CELEBES)

H. J. PARIS
AMSTERDAM - 1924

AAN
MIJN VROUW

Bij de voltooiing van dit proefschrift betuig ik U, Hoogleeraren en Lectoren van de Wis- en Natuurkundige en Medische Faculteit der Utrechtsche Hoogeschool mijn hartelijken dank voor het onderwijs, dat ik van U mocht genieten.

U, Hooggeleerde Noordenbos en Zeeman, ben ik zeer erkentelijk voor de gastvrijheid, die ik in Uwe klinieken mocht ondervinden.

Dat ik onder Uwe leiding, Hooggeleerde Van Loghem, Hooggeachte Promotor, mijne Academische studie heb mogen beeindigen, zal ik steeds op zeer hoogen prijs blijven stellen.

U, Hooggeleerde Kuenen, Schüffner en Swellengrebel, ben ik veel dank verschuldigd voor het onderricht, dat ik van U mocht ontvangen gedurende den tijd, dien ik aan de afdeeling Tropische Hygiëne van het Koloninaal Instituut heb doorgebracht.

Ten slotte mijn welgemeenden dank aan allen, die hebben bijgedragen tot het welslagen van dit proefschrift.

INHOUD

Blz.

I. Inleiding 1

II. Inrichting en werking van septictanks 2

III. Levensduur van pathogene darmbacteriën in septictanks 7

IV. Opruiming van bacteriën in vervuild water . . . 14

V. Toegepaste chemische en bacteriologische werkwijzen 18

1. *Beschrijving van de proefseptictank* 18

2. *Chemische werkwijzen* 19

3. *Bacteriologische werkwijzen* 20

VI. De proefseptictank chemisch en bacteriologisch onderzocht, in en buiten werking 24

1. *De proefseptictank in werking* 24

2. *De proefseptictank buiten werking* 28

VII. Eigen proeven over pathogene darmbacteriën en en septictank 31

1. *De invloed der chemische samenstelling van de vloeistof.* 31

2. *De invloed der waterstofionenconcentratie van de vloeistof.* 32

3. *Protozoën* 37

VIII. Proeven met vloeistof der proefseptictank na doorvoering van lucht 41

1. *De werkwijze, volgens welke de proefseptictank „gelucht" werd* 45

2. *Pathogene darmbacteriën in vloeistof der „gelucht" proefseptictank* 45

IX. Samenvatting 48

X. Conclusies 50

XI. Geraadpleegde litteratuur 51

I. Inleiding.

In de tropische kamer van de afdeeling Tropische Hygiëne van het Koloniaal Instituut, is sinds verscheidene jaren een kleine proefseptictank geplaatst, zoowel ter demonstratie van de biologische en chemische processen, als ter onderzoek van bepaalde vragen, die zich van hygiënisch standpunt uit ten aanzien van dit biologische proces kunnen voordoen.

Eén dier vragen betreft den invloed van den inhoud van de septictank op de pathogene darmbacteriën.

Uit niet gepubliceerde proeven van Professor Van Loghem mocht worden besloten, dat de vloeistof van een „goedwerkende" tank een minder nadeeligen invloed op pathogene darmbacteriën uitoefent, dan die van een verwaarloosde tank, en dat de doodende invloed van de tankvloeistof op pathogene darmbacteriën op de aanwezigheid van protozoën zou berusten.

Gaarne heb ik de gelegenheid aangegrepen gedurende den leergang, dien ik aan het Tropisch Instituut volgde, dit punt nader onder de oogen te zien.

Ik heb dan de biologie van de septictank trachten te overzien, zoowel in goedwerkenden toestand als in verwaarloosden toestand, en de reinigende werking van het tankvocht op pathogene darmbacteriën nagegaan.

Bij dit onderzoek wijdde ik in de eerste plaats mijn aandacht aan de werking van protozoën. Want door onderzoekingen over zoogenaamde „zelfreiniging" is immers gebleken, dat deze organismen een zeer belangrijke rol spelen bij de opruiming van bacteriën in de buitenwereld.

Naast den invloed van protozoën, heb ik dien der chemische samenstelling van de tankvloeistof op pathogene darmbacteriën onderzocht.

II. Inrichting en werking van septictanks.

Onder de verschillende systemen ter zuivering van afvalstoffen, heeft een tijd lang de septictank een belangrijke plaats ingenomen, en in de tropen doet zij dit nog, in het bijzonder voor den afvoer van faeces.

In beginsel komt het systeem hierop neer, dat afvalstoffen met spoel- en afvalwater in een waterdichten bak worden opgevangen, korteren of langeren tijd daarin aan zich zelf worden overgelaten, terwijl het water aanhoudend kan blijven afloopen.

Een vereischte is, dat steeds nieuw materiaal wordt aangevoerd en het in het bassin aanwezige water gedeeltelijk wegstroomt.

Tijdens het verblijf in den bak ontstaan er door de daarin meegekomen organismen, rottings- en gistingsprocessen, waardoor de verschillende organische stoffen voor een groot deel omgezet worden in mineraalzouten, gassen en organische verbindingen van eenvoudiger samenstelling. Verversching is noodzakelijk, daar anders de microben, die de biologische processen tot stand brengen, te gronde zouden gaan, waarbij dan tevens de omzettingen tot staan zouden komen.

Het was de Fransche ingenieur Mouras, die het eerst waarnam, dat een waterdichte bak, waarin geregeld faecaliën en spoelwater stroomden, en waaruit een geleidelijke afloop van vloeistof plaats vond, zelfs na maanden lang gebruik niet behoefde geledigd te worden. Verder vond hij, dat de hoeveelheid in den bak aanwezige organische stof veel geringer was dan de totaal ingebrachte en bijna niet vermeerderde, niettegenstaande de vloeistof, die uit de afloop stroomde, zeer weinig vaste bestanddeelen bevatte. Tevens nam hij gasvorming waar.

Hij stelde dus vast, dat de onopgeloste stoffen, met een voldoende hoeveelheid water in een niet lekkenden bak gebracht, veranderden in een weinig troebele, bruine, faecaalriekende vloeistof en gassen. De „fosse Mouras" vond echter in Frankrijk geen waardeering als middel voor afvalreiniging.

In 1895, ruim 30 jaar nadat Mouras zijne vinding deed, bouwde Cameron, een ingenieur te Exeter in Engeland, een installatie, die in beginsel overeenkwam met die van Mouras. In Engeland maakte dit procédé veel opgang, zoodat weldra talrijke „septictanks" of „Camerontanks", zooals de rottingskelders in Engeland genoemd worden, in gebruik kwamen. Door het betere, hoewel nog poovere inzicht, dat omtrent de processen in den rottingskelder verkregen werd, zijn veranderingen en verbeteringen in den bouw van den oorspronkelijken bak aangebracht, die dienden om het meest nuttig effect van de werkende tank te bereiken.

Daar mijn proeven zijn uitgevoerd met een proefseptictank, waarin als materiaal uitsluitend faecaliën werden gebezigd, wil ik hier een korte beschrijving laten volgen van de inrichting van een septictank, zooals Clemesha die uitwerkte. Hij toch richtte zijn tanks in hoofdzakelijk voor afvoer van faeces in de tropen. Den bak verdeelde hij in twee ruimten, den z.g. „gritchamber" en den oorspronkelijken rottingskelder. De afscheiding werd verkregen door een tusschenschot, waarin zich een spleetvormige opening bevond, zoodat beide afdeelingen toch met elkaar in verbinding stonden. De „gritchamber", ongeveer $^1/_8$ van den inhoud van den geheelen bak, heeft ten doel de te reinigen stoffen op te vangen. Door deze ruimte in te schakelen, wordt voorkomen dat door het binnenstroomen van het spoelwater de inhoud van de tank opwervelt en in beroering komt, waardoor vele vaste, nog onverteerde deelen naar de uitlaat worden gevoerd. Bovendien wordt een groot deel der onverteerbare stoffen in de opvangkamer vastgehouden, die in den eigenlijken rottingskelder storend zouden kunnen werken.

In de opvangkamer heeft reeds een groot deel van de ver-

tering plaats. Het bezwaar, dat deze ruimte spoedig zou verstoppen, wordt door Clemesha op grond van zijn ervaring tegengesproken. Op deze wijze kunnen de nog onverteerde en slechts ten deele verteerde stoffen geleidelijk in de eigenlijke tank komen en daar verder worden omgezet.

Ten nauwste met de goede werking van een septictank hangt samen de hoeveelheid spoelwater, die bij de vaste deelen moet worden gevoegd, om een zoo volledig mogelijke omzetting te verkrijgen. Door langdurige proefnemingen kwam Clemesha tot het resultaat, dat voor een septictank in de tropen, uitsluitend ingericht voor het verwerken van faeces, een verdunning van ongeveer 25 L. spoelwater per persoon per dag de beste uitkomsten gaf.

Hoe lang dienen de faeces in de tank te vertoeven om zoo volledig mogelijk te worden omgezet? Dat daartoe de kortst mogelijke periode moet gekozen worden, is duidelijk, als men in aanmerking neemt, dat dit mede de belangrijkste factor is bij de bepaling van den inhoud van een te bouwen tank. Clemesha achtte voor de tropen een doorstroomingstijd van drie dagen den meest wenschelijken.

Verscheidene onderzoekers hebben zich bezig gehouden met onderzoekingen omtrent den aard der processen, die zich in dergelijke septictanks afspelen. Het zijn vooral de onderzoekingen geweest van de Royal Commission of sewage disposal in Engeland, Clemesha, de septictank commissie in Nederland, Groenewege, Söhngen, Calmette en Dunbar met zijne medewerkers, e.a. die een beter inzicht hebben gegeven in deze zeer ingewikkelde en veelzijdige processen. Want dat deze processen samengesteld en veelzijdig zijn, mogen de proeven van Favre, in het instituut te Hamburg uitgevoerd, bewijzen. Hij plaatste allerlei vaste organische stoffen zóódanig in een septictank, dat zij voortdurend in aanraking waren met de rottende vloeistof maar noch geheel, noch gedeeltelijk konden wegspoelen. Hiervoor maakte hij gebruik van gesloten bussen, waarin gaatjes van 1 m.M. in doorsnede waren gemaakt. De te onderzoeken

voorwerpen werden, nadat zij gewogen waren, in deze bussen geplaatst; de bussen werden daarna in de septictank neergelaten. Van tijd tot tijd werd opnieuw het gewicht bepaald.

Op deze wijze werden onderzocht eiwitten in den vorm van rauw en gekookt vleesch, visch, geplukte en ongeplukte duiven en caviae; vetten in den vorm van eierdooiers, boter en talk; koolhydraten in den vorm van koolen, rauwe en gekookte aardappelen. Verder werden andere stoffen als papier, wol, hennep, kurken, pezen en kraakbeen aan den invloed van tankvloeistof blootgesteld.

Hij nam nu waar, dat de voorwerpen eerst zwollen en in gewicht toenamen, maar daarna geleidelijk in gewicht afnamen. Echter niet alle in dezelfde mate en in hetzelfde tijdsverloop. Eiwitten werden het snelst verteerd: van caviae werd na 3 à 4 weken slechts het geraamte terug gevonden. Daarna volgden de koolhydraten: een rauwe kool was na 5 weken nog slechts voor 0.5 % aan het oorspronkelijke gewicht aanwezig. Vetten vertoonden den meesten weerstand tegen de omzetting; kurk werd in het geheel niet aangetast.

Ter vergelijking werden dezelfde proeven gedaan in stilstaand rottend water en in stroomend leidingwater. Het bleek, dat in stilstaand rottend water de ontleding sterk geremd werd en veel langer duurde dan in de septictank, waarin strooming en verversching plaats vond, terwijl in stroomend leidingwater de voorwerpen weinig of in het geheel niet aangetast werden.

Door scheikundige analyses hebben bovengenoemde onderzoekers een denkbeeld trachten te verkrijgen van de splitsingsprodukten, die bij de ontleding van de drie hoofdbestanddeelen van het menschelijk voedsel, n.l. eiwitten, koolhydraten en vetten, ontstaan.

Komen eiwitten in een rottingskelder, dan ondergaan zij omzettingen, die gepaard gaan met vorming van stinkende gassen. Als eerste splitsingsprodukten worden gevormd peptonen en hemialbumosen; deze worden verder afgebroken tot amido- en aminoverbindingen, aromatische stoffen, die den

stank veroorzaken, stikstofvrije vet- en carbonzuren. Als eindprodukten kunnen ammoniak, zwavelwaterstof, stikstof, koolzuur en methaan gevonden worden. In hoeverre nitrieten en nitraten reeds in de tank gevormd worden, is nog niet met zekerheid uitgemaakt. Groenewege meent, dat de nitrificatie reeds in den rottingskelder een begin maakt; Bach en Sierp ontkennen dit. De laatsten meenen, dat de afbraak in de tank niet verder gaat dan tot de vorming van ammoniak, terwijl stikstof, buiten de nitrieten om, vrij komt.

De koolhydraten worden door gistingsprocessen ten slotte gesplitst tot methaan, koolzuur en water.

Vetten worden moeilijk aangetast; zij worden geëmulgeerd, en afgebroken tot vetzuren. Al deze omzettingen zijn terug te brengen tot een combinatie van microbiologische processen.

Van de verschillende micro-organismen, die bij deze omzettingen een rol spelen, is zeer weinig zekers bekend. Met zekerheid is bekend, dat bepaalde organismen een belangrijk aandeel bij het afbreken der stoffen hebben; over de splitsingsprodukten, die zij vormen, loopen echter de meeningen weer uiteen.

Heeft een septictank eenigen tijd onder gunstige voorwaarden dienst gedaan, dan kan men daarin drie lagen onderscheiden:

de sliblaag, op den bodem der tank, bestaande uit de zwaardere organische en anorganische stoffen, die nog niet opgelost of onoplosbaar zijn; de drijflaag, bestaande uit de lichte, onoplosbare organische stoffen en de vloeibare laag, tusschen de beide andere in. Deze zône wordt gekarakteriseerd door haar min of meer sterk ammoniakgehalte en zij bestaat gewoonlijk uit een als bouillon gekleurde, weinig troebele vloeistof. Deze en de sliblaag vormen de anaërobe omgeving, waarin zich de rottings- en gistingsprocessen afspelen.

Het is ook ter hoogte van de middelste, vloeibare laag, dat de uitlaat moet aangebracht worden, om de opgeloste stoffen te doen wegstroomen. Want hier zal de minste kans bestaan, dat de uitlaat verstopt raakt.

III. Levensduur van pathogene darmbacteriën in septictanks.

Voor ik tot mijn doel overga, nader integaan op de factoren, die het standhouden of het te gronde gaan van pathogene darmbacteriën in septictanks bepalen, wil ik thans eerst een kort overzicht geven van wat door anderen ten aanzien van dit vraagstuk reeds is meegedeeld, in het bijzonder omtrent den levensduur van pathogene darmbacteriën in septictanks en rottend afvalwater.

Toen de septictank doelbewust in gebruik werd genomen ter verwijdering en opruiming van faecaliën, werd al spoedig de vraag opgeworpen, hoe pathogene darmbacteriën, die met de faeces van besmette personen in septictanks waren geraakt, zich in deze rottende omgeving zouden gedragen. Konden zij daarin blijven leven of stierven zij af? De beantwoording dezer vragen was in de eerste plaats epidemiologisch van belang. Want, mocht blijken, dat ziektekiemen de tanks passeerden, dan zou het effluent wegens het infectiegevaar niet zonder meer in open wateren mogen worden geloosd, maar onschadelijk moeten worden gemaakt.

Horrocks toonde typhusbacillen, geënt in vloeistof, afkomstig van een septictank, na 60 dagen nog aan, mits hij te voren alle andere bacteriën door filtratie uit de vloeistof had verwijderd. De chemische samenstelling van het tankwater oefende geen schadelijken invloed op den typhusbacil uit.

In „The Second Report of the Royal Commission on sewage disposal" deelt Mc Conkey de resultaten mede van proeven, genomen om den levensduur van typhusbacillen in afvalwater en effluent van verschillende inrichtingen ter behandeling van afvalwater, na te gaan.

Bij de experimenten werd ongesteriliseerd effluent gebruikt

en effluent, dat bij 65° C. gedurende 45 minuten verhit was. Mc Conkey hoopte namelijk door deze verhitting de vloeistof bacterie-vrij te maken, maar de stofwisselingsprodukten der bacteriën niet te vernietigen. Het bleek inmiddels door contrôle proeven, dat dit niet het geval was, daar uit de verhitte vloeistof nog kiemen te kweeken waren. Deze proefnemingen met ongesteriliseerd en verwarmd effluent hadden ten doel uit te maken of de daarin gebrachte typhusbacillen, als zij afstierven, gedood waren door overwoekering der overige microben dan wel door de stofwisselingsprodukten van deze. Zooals reeds opgemerkt, kon uit de proeven met verhitte tankvloeistof geen definitieve slotsom getrokken worden. Zoo werden dan 600 cc. effluent in steriele flesschen gedaan en geënt met 1 cc. van een 24 uur oude typhuscultuur in bouillon. De flesschen werden in het donker bij kamertemperatuur neergezet en de vloeistof werd op bepaalde tijden onderzocht op aanwezigheid van typhusbacillen. Deze werden biochemisch en serologisch geïdentificeerd. Uit de uitkomsten van zijn proefnemingen met het effluent van een open septictank blijkt, dat het aantal typhusbacillen in de flesschen geleidelijk afnam. Uit de tabellen blijkt evenwel ook, dat na één maand nog veel typhusbacillen in de vloeistof aanwezig waren. Hij komt tot de slotsom: „the fluids, experimented with, are inimical to the bacillus typhosus". Over het wezen van dien schadelijken invloed laat hij zich echter niet uit.

Rogers heeft nagegaan, welke chemische werking vloeistof uit een septictank op typhusbacillen en choleravibrionen uitoefent. Daartoe werd vloeistof, afkomstig van een rottingskelder, gefiltreerd door een porceleinen filter en geënt met typhusbacillen. Onmiddellijk daarna werd het aantal geënte bacillen bepaald, en de suspensie in een zuurstofvrije omgeving gebracht. Dagelijks werden de bacillen opnieuw geteld. Als contrôle werd een suspensie van typhusbacillen in sterielwater gebruikt. Het resultaat der proefnemingen was, dat 5 dagen na de enting uit het effluent geen typhusbacillen meer waren te kweeken. Maar ook in de contrôles ging het aantal typhusbacillen achteruit, ofschoon lang-

zamer. Op dezelfde wijze werden proeven ingesteld met choleravibrionen. In de zes genomen experimenten konden na 3 dagen de choleravibrionen noch uit het tankwater, noch uit de contrôles worden gekweekt: „so that it would appear, that there is little likelihood of this organism surviving the action of the septic-tank process."

De conclusie, die Rogers uit zijn proeven met typhusbacillen trekt, is de volgende: „It appears then, that the chemical conditions of the septictank are distinctly inimical to the typhoïd-bacillus which rapidly decreases and after a few days disappears, when exposed to its influence under anaërobic conditions, such as obtain in the septictank."

Calmette meende, dat typhusbacillen en choleravibrionen reeds na een ééndaagsch verblijf in een septictank overwoekerd en gedood waren.

Fürbringer en Stietzel vingen effluent van een septictank op in steriele flesschen en entten hierin typhusbacillen resp. choleravibrionen. Het effluent had een alcaliniteit, die overeenkwam met 18 cc. N. zoutzuur per L., en bevatte 2.4—2.6 cc. zuurstof per L. vloeistof. De geënte flesschen werden in de tank gehangen, zóó, dat de waterspiegel in flesschen en tank gelijk was. Van tijd tot tijd werden monsters ter onderzoek uit de flesschen genomen. Uit dit onderzoek bleek, dat uit vier niet-luchtdicht afgesloten flesschen nog na 85 dagen choleravibrionen te kweeken waren; uit één flesch zelfs nog na 106 dagen. Uit drie open flesschen, waarin typhusbacillen geënt waren, konden zij na een verblijf van 54 dagen, resp. 70 dagen en 85 dagen nog gekweekt worden. Werden echter de geënte flesschen in de tank opgehangen, nadat zij van de lucht waren afgesloten, dan waren de choleravibrionen niet meer na 13 dagen, en de typhusbacillen niet meer na 4 weken aan te toonen.

Dunbar schrijft in zijn „Leitfaden für die Abwasser-reinigungs-frage": „Vielvach wird angenommen, pathogene Keime würden in Faulbecken erheblich geschädigt oder ganz innerhalb kurzer Zeit getötet." De proeven, die hij daarover in Hamburg nam,

hebben hem van dit feit niet kunnen overtuigen; want phosphoresceerende vibrionen, die in gevoeligheid te vergelijken zijn met Vibrio cholerae, konden een verblijf van 33 dagen in een septictank doorstaan. „Dieses Beispiel dürfte genügen, um zu zeigen, dasz der Faulprozesz eine sichere Gewähr für Beseitigung der Infektionserreger durchaus nicht bietet."

Gärtner ging den levensduur van typhusbacillen en choleravibrionen na in het water uit de septictank van het hygiënisch laboratorium te Jena en vond, dat bij aanwezigheid van zuurstof choleravibrionen na 85 dagen nog uit de vloeistof te kweeken waren, terwijl zij uit zuurstofvrije vloeistof na 3 weken waren aan te toonen. De meer resistente typhusbacillen werden nog na 6 weken aangetroffen.

Naar aanleiding van de vraag, of het effluent van rottingskelders, zonder meer op rivieren mocht worden geloosd, gingen Eijken en Grijns den levensduur na van typhusbacillen en choleravibrionen in materiaal, dat geleverd werd uit twee putten, „die om hunne bijzondere ligging en bouw als open septictanks konden worden beschouwd." Het effluent van deze putten werd in flesschen opgevangen, daarna geënt met een cultuur van typhusbacillen en choleravibrionen en van tijd tot tijd onderzocht op aanwezigheid van bovengenoemde organismen. Het resultaat van hunne proefnemingen was, dat zij in vele gevallen den typhusbacil nà 3 dagen uit de flesschen konden isoleeren, terwijl het hun in één der proeven nog na 7 dagen gelukte. De choleravibrio was bij 13 proefnemingen éénmaal na 2×24 uur aan te toonen, en negen maal na 1×24 uur.

Zij besloten uit de resultaten van hun proeven, dat choleravibrionen binnen 3 dagen in een septictank te gronde gaan, maar dat typhusbacillen niet alle gedood worden, ook al heeft de tank een inhoud voor drie dagen. Zij worden echter wel verhinderd zich te vermenigvuldigen.

Nadat Flu van eenige septictanks, waarvan het zeer waarschijnlijk was, dat zij door typhuslijders waren besmet, het effluent had onderzocht en hierin geen typhusbacillen had kunnen

aantoonen, kwam het hem wenschelijk voor deze tanks kunstmatig met groote hoeveelheden typhusbacillen en choleravibrionen te infecteeren en te zien of deze pathogene darmbacteriën zich nù in het effluent vertoonden. „Een negatief resultaat, hierbij bereikt, zou voor de practische beoordeeling van de gevaarlijkheid van het effluent zeker van groote beteekenis zijn."

Flu was instaat om uit het effluent van één der door hem besmette tanks na 5 × 24 uur nog typhusbacillen te kweeken, terwijl het hem in de overige gevallen na 4 × 24 uur niet meer gelukte.

Geënte choleravibrionen kon hij uit het effluent van één tank nog 1 × 24 uur na de enting aantoonen, maar niet meer na 2 × 24 uur. Bij het onderzoek van het effluent der overige geïnfecteerde tanks waren zijn vondsten na 1 × 24 uur negatief.

Ten slotte wil ik de proeven van Kligler mededeelen.

Voor zijn laboratorium proeven gebruikte hij proeftanks, die bestonden uit een gegalvaniseerden bak, de eigenlijke tank, en een glazen vat, waarin het effluent kon worden opgevangen.

Nadat de tanks 3 weken in werking waren geweest, werden de proeven aangezet. Zoowel in de eigenlijke tanks als in den opvang bak werden entingen gedaan, en wel met 24 uur oude bouillonculturen van verschillende pathogene darmbacteriën.

Dagelijks werden uit de bakken vloeistofmonsters genomen en getracht hieruit de geënte kiemen te kweeken.

De typhusbacil kon, na een verblijf van 6 à 8 dagen in de faecale vloeistof bij een temperatuur van 20°—24° C., daaruit niet meer gekweekt worden. De dysenteriebacil van Flexner was na een verblijf van 4 dagen niet meer aan te toonen. Bij één der experimenten met typhusbacillen was gebleken, dat op den 14en dag na de enting nog typhusbacillen uit de vloeistof te voorschijn kwamen. In dit geval was, onder overigens gelijke omstandigheden, de alcaliniteit van de vloeistof (P_H 7.4—7.8) lager, dan die van het tankwater, waarmee de andere proeven waren verricht. (P_H 8.4—8.8). Dit was een aanwijzing voor den belangrijken invloed, dien de alcaliniteit der vloestof op den levensduur van pathogene bacteriën zou kunnen hebben. Om

dit nader te onderzoeken, werden effluents, wier waterstofionenconcentratie nog al uitéén liepen, met pathogene darmbacteriën geënt.

Deze proeven bevestigden de eerste waarneming. In rottende vloeistof met een hooge alcaliniteit stierven typhus- en dysenteriebacillen eerder af dan in een vloeibare faecale omgeving, waarin een lage alcaliniteit heerschte. De nadeelige invloed begon zich bij $P_H = 8.6$ te doen gevoelen.

In aansluiting aan laboratoriumproeven, deed Kligler in deze richting onderzoekingen met een dertigtal septictanks, die in verschillende steden waren aangelegd. Alle tanks waren tijdens het onderzoek in volle werking. De perioden gedurende welke deze rottingskelders in gebruik waren, wisselden tusschen de 3 maanden en 3 jaar.

Om te kunnen constateeren of typhusbacillen, in een septictank gebracht, inderdaad de uitlaat bereikten, werd een bouilloncultuur van deze bacteriën in een rottingskelder gebracht en onmiddellijk daarna twee emmers water in de tank gestort. Achtereenvolgens na 4, 6, 24 en 50 uur werden wederom twee emmers water in de tank gegoten en terstond daarna het effuent ter onderzoek opgevangen. Geen enkele maal lukte het, typhusbacillen uit het effuent te kweeken.

Toen deze directe proeven geen bevredigende resultaten gaven, werd effuent van een achttal tanks in steriele flesschen opgevangen, geënt met een bouilloncultuur van typhus- en dysenteriebacillen; het aantal geënte bacteriën werd terstond bepaald. Daarna werden de flesschen weggezet bij een temperatuur van ongeveer 29° C. en dagelijks de aanwezige bacteriën geteld.

De slotsom, uit een geheele reeks proeven samengevat, wees uit, dat, bij een temperatuur van ongeveer 29° C. in een effluent, met een waterstofionenconcentratie, die wisselde tusschen P_H 7.7 en P_H 8.1, typhusbacillen 4 dagen, en dysenteriebacillen 1 dag na enting, niet meer aan te toonen waren.

Kligler geeft zijn meening over de doodende werking van septictankvloeistof op pathogene darmbacteriën als volgt weer:

„The germicidal power of the effluent from a ripe tank is probably due both to the alkaline reaction and the presence of the antagonistic product of metabolism." Bovendien maakt hij bij de beschrijving van de werking der rotting der rottingskelders de opmerking:

„In all these types the liquefying bacteria are depended upon to desintegrate the solid feces and destroy the pathogens."

Samenvatting.

Als men de resultaten der proefnemingen van bovengenoemde onderzoekers samenvat, kan het volgende worden vastgesteld.

1. Er bestaat geen overeenstemming over den levensduur van pathogene darmbacteriën in septictanks of in vloeistof, afkomstig uit rottingskelders.

2. Voorzoover de onderzoekers uit hunne proeven meenen te moeten aannemen, dat pathogene darmbacteriën in rottende vloeistof te gronde gaan, is door hen in dit verband geen nader onderzoek ingesteld naar de factoren, welke de doodende werking uitoefenen. Slechts Kligler toont door zijne waarnemingen aan, dat de waterstofionenconcentratie van de vloeistof een belangrijke factor voor het afsterven kan zijn.

Uit dit overzicht moge dan gebleken zijn, dat sommige onderzoekers schadelijke invloeden aannemen, de gevaren, die het lot van pathogene darmbacteriën in de buitenwereld bedreigen zijn echter bij het onderzoek van de vloeistof uit septictanks niet onder de oogen gezien.

In het bijzonder lijkt het mij van belang na te gaan, in hoeverre datgene, wat in de laatste jaren bekend is geworden, omtrent de zoogenaamde „zelfreiniging" van vervuild water, — bij welk proces protozoën gebleken zijn een rol te spelen — voor dit vraagstuk beteekent.

In het volgende hoofdstuk wil ik dus, alvorens tot de meedeeling van eigen proeven over te gaan, kort het vraagstuk van de zoogenaamde „zelfreiniging" door protozoën, d. w. z. het vernietigen van bacteriën door protozoën in de buitenwereld, aanstippen.

IV. Opruiming van bacteriën in vervuild water.

Het is een reeds lang bekend verschijnsel, dat vuil, onrein water, aan zichzelf overgelaten, helder, rein wordt: „zich zelf reinigt."

Aanvankelijk werd de zuiverheid van water naar zijn scheikundige samenstelling beoordeeld, vandaar, dat naar een verklaring voor de zelfreiniging in chemische richting werd gezocht. Zoo werd o.a. door Hulwa de stelling verdedigd, dat de zelfreiniging der rivieren tot stand kwam door oxydatie der organische stoffen door middel van zuurstof. Toen echter bleek, dat de „reinheid" van het water veel meer afhankelijk was van het aantal en de soort bacteriën, die erin voorkwamen, dan van de chemische samenstelling, werd de aandacht op de microben gevestigd. En het onderzoek bracht aan het licht, dat ook de bacteriën in verontreinigd water, in aantal afnemen.

Voor de vermindering van het aantal bacteriën was de oxydatie-theorie onbevredigend, zoodat weldra verschillende andere theorieën werden opgesteld en verdedigd.

Frank en Prausnitz meenden de afneming van het gehalte aan bacteriën hoofdzakelijk te moeten toeschrijven aan sedimentatie. Met het bezinken der zwaardere stoffen zouden de microben mede neerslaan en zoo uit het water verdwijnen.

Op grond van zijn proeven was Buchner van meening, dat het zonlicht, tot op een bepaalde diepte in het water doordringend, de bacteriën-doodende werking tot stand bracht.

Hankin, die de Ganges en de Jumna onderzocht, trof het, dat het water dezer rivieren zeer arm aan bacteriën was. Bovendien lukte het hem nooit choleravibrionen te vinden, hoewel beide rivieren voortdurend zwaar besmet werden door de faeces

der talrijke choleralijders. Hankin nam aan, dat er een toxische, verder niet te definieeren stof in bovengenoemde rivieren aanwezig was, die het water snel en krachtig reinigde.

Naast deze onderzoekers zijn er andere, die een biologische verklaring voor de zelfreiniging aan de hand deden.

Löw, gesteund door von Pettenkofer, zag in de algen de reinigers van het water.

Hilsum, die een uitgebreide studie heeft gemaakt over de zelfreiniging in het zwembad op den Heiligenweg te Amsterdam, en die in zijn proefschrift een vrijwel volledig litteratuuroverzicht over dit onderwerp gaf, zag in de afneming van het aantal bacteriën een strijd om het bestaan: hoe meer soorten aanwezig waren, hoe beter zelfreiniging optrad.

Geen dezer theorieën bevredigden echter, want zij konden de snelle vermindering der bacteriën in sterk verontreinigd, aan zich zelf overgelaten water, niet aannemelijk maken.

Dit was wel het geval, toen Emmerich en Gmund er den aandacht op vestigden, dat protozoën in het algemeen, en flagellaten in het bijzonder, in korten tijd een groot aantal bacteriën kunnen verslinden.

Toen laatstgenoemde onderzoekers hun waarneming hadden bekend gemaakt, hebben Huntemüller, en na hem Stokvis en Swellengrebel, overtuigend bewezen, dat de snelle afneming van het aantal kiemen in verontreinigd water te verklaren is door de vraatlust der protozoën.

Deed Huntemüller bij een suspensie van typhusbacillen in steriel water, zeer kleine hoeveelheden rivierwater, tot zelfs 0.05 cc. toe, dan zag hij de aanvankelijk troebele vloeistof, na eenige dagen helder worden. Voegde hij aan een suspensie typhusbacillen echter sterilewater toe, dan bleef de vloeistof troebel. Door op gezette tijden het aantal gesuspendeerde typhusbacillen te tellen, nam hij waar, dat in de vloeistof met rivierwater het aantal sterk verminderde, terwijl dit in de vloeistof, waarbij steriel water gevoegd was, niet het geval was.

Bovendien constateerde hij in de eerste vloeistof de aanwezig-

heid van een groot aantal flagellaten, die natuurlijk in de steriele vloeistof niet aanwezig waren. Door een bepaalde kleurmethode toe te passen zag Huntemüller onder het microscoop, dat bacteriën in grooten getale door flagellaten werden opgenomen. Naar aanleiding van nog vele andere proeven besluit hij; „Durch diese Versuche und mikroskopische Befunde ist es wohl über allen Zweifel festgestellt, dass die Vernichtung der Typhuskeime im Wasser nicht durch das Überwuchern und die Konkurrenz der Wasserbakteriën, sonder hauptsächlich auf die Tätigkeit der Protozoën zurück zu führen ist."

Stokvis heeft de zaak nog strikter geformuleerd. Door een suspensie van bacteriën, te zamen met protozoën, in een vloeistof te brengen, die 0.1 pro mille cyaankalium bevatte, werden de protozoën gedood, de bacteriën daarentegen niet in hun groei belemmerd of tot vermenigvuldigen geprikkeld. In een dergelijke vloeistof had geen „zelfreiniging" plaats, terwijl in de contrôle vloeistof, onder overigens precies dezelfde omstandigheden, maar bij afwezigheid van cyaankalium, het aantal bacteriën in korten tijd sterk verminderde. Hij knoopte er de volgende conclusie aanvast: „Door het toevoegen van KCN (0,1 $^0/_{00}$) aan een bacteriën houdend water wordt de zelfreiniging tegen gehouden, tegelijkertijd weten we, dat hij dit gehalte, flagellaten afsterven, bacteriën niet. Dit uitblijven der zelfreiniging moet dus aan het afsterven der flagellaten geweten worden, dus spelen bij de zelfreiniging van water de protozoën, en speciaal de flagellaten, waarschijnlijk een groote rol."

Moge ik volstaan met het noemen van deze twee onderzoekers, die door hunne proeven de groote rol, welke protozoën bij het belangwekkend verschijnsel der „zelfreiniging" spelen, in het licht hebben gesteld.

Zooals in het eerste hoofdstuk is vermeld, berust de werking van een rottingskelder op „zelfreiniging": immers, de afvalstoffen met spoelwater, worden aan zichzelf overgelaten en reiniging, in scheikundig opzicht, wordt waargenomen.

Maar vindt er ook een zelfreiniging in bacteriologischen zin plaats? Met andere woorden, spelen de protozoën in een septictank een dergelijke belangrijke rol als in slooten, rivieren, vijvers, poelen en ander oppervlakte water? Want hierdoor toch, zal, zooals bovengenoemde onderzoekers bewezen, voor een belangrijk deel het lot van pathogene bacteriën afhangen!

Bij het nemen van de hierna te vermelden proeven, heeft de bedoeling voorgezeten, na te gaan, of in de vloeistof van een septictank „zelfreinigende eigenschappen" aanwezig zijn, die pathogene darmbacteriën zouden kunnen doen verdwijnen.

V. Toegepaste chemische en bacteriologische werkwijzen.

1. *Beschrijving van de proefseptictank.*

De genomen proeven werden verricht met effluent van de proefseptictank. die geplaatst was in de tropische kamer van het laboratorium voor Gezondheidsleer te Amsterdam.

De temperatuur werd in bovengenoemde kamer over dag en des nachts op peil gehouden en wisselde tusschen 26° en 30° C.

Deze proeftank (zie foto) bestaat uit een glazen bak, met een lengte van 54 c.M., breedte van 35 c.M., en diepte van 32 c.M., aan den buitenkant der tank gemeten. Een gelakte deksel sluit den bak af.

In den deksel zijn drie openingen gemaakt. De opening (A), links op de foto, afgesloten door een schaal van Petri, wordt gebezigd om faecaliën in den bak neer te laten. De andere opening links (B), die in verbinding met de twee flesschen staat, dient om het spoelwater toe te laten vloeien. Een derde opening, rechts (C), werd met een waschfleschje verbonden om de gassen, die zich eventueel boven in den bak ophoopten, af te voeren. De uitlaat (D) bevindt zich, als de tank tot op de gewenschte hoogte gevuld was, juist in de vloeibare laag. Door nu de uitlaat met een gummislang (E) te verbinden en deze op hetzelfde niveau van de vloeistof in de tank, te plaatsen, blijft de inhoud in den bak constant.

De bak wordt door een glazen scherm in twee deelen verdeeld, de „ontvangkamer" of „gritchamber" (G), en de eigenlijke tank (H). Het scherm, (F) dat op de photographie te herkennen is aan de onregelmatige streep, die op de linker helft van den bak verloopt, staat ongeveer 16 c.M. van den dichtst bij zijnden wand af. Een spleetvormige ruimte van 5 c.M., gemeten van

De proefseptictank, die voor de proeven gebruikt werd.

den bodem der tank tot den onderrand van het glazentusschenschot, zorgt voor de verbinding tusschen de opvangkamer en het grootere deel der tank.

Het spoelwater werd druppelsgewijs vanuit de twee met elkaar in verbinding staande flesschen in den „gritchamber" gelaten. De toevoer kon door middel van een, op de foto zichtbare klem (K), geregeld worden.

Om een inzicht te verkrijgen, in welken toestand de tank in scheikundigen en bacteriologischen zin, op een bepaald oogenblik verkeerde, werden de volgende bepalingen gedaan.

Chemische bepalingen.
- Ammoniakgehalte.
- Zuurstofgehalte.
- Methyleenblauwproef.

Bacteriologische bepalingen.
- Totaal aantal kiemen.
- Colititer.
- Proteustiter.
- Anaërobentiter.

Moge hier een korte uiteenzetting van de gevolgde werkwijzen volgen:

2. *Chemische werkwijzen.*

Ammoniakgehalte.

Dit werd bepaald, colorimetrisch, met het reagens van Nessler.

Zuurstofgehalte.

De kwantitatieve zuurstofbepaling in sterk verontreinigd water, ging met moeilijkheden gepaard. Winkler heeft echter een methode aangegeven, waardoor sporen zuurstof kunnen worden vastgelegd en kwantitatief bepaald. Door onmiddellijk bij het opvangen van het te onderzoeken water, een bepaalde hoe-

veelheid chloorkalk toe te voegen, wordt het eventueel aanwezige salpeterigzuur en de organische stoffen geoxydeerd; op deze wijze wordt de zuurstof, als zij aanwezig is, niet verbruikt voor de oxydatie. Voor de eigenlijke zuurstofbepaling wordt manganosulfaat, en voor het aanzuren zwavelzuur gebruikt.

Methyleenblauwproef.

De proef, ook wel incubatieproef genoemd, is door Spitta aanbevolen, en berust op de reduceerende werking van rottingsprodukten; in het bijzonder van zwavelwaterstof.

Wordt bij rottend water per 50 cc., 0.3 cc. van een 0.05 procentige, waterige oplossing van methyleenblauw gedaan, dan zal na korteren of langeren tijd het aanvankelijk blauwgekleurde water ontkleurd worden.

Heeft bij een temperatuur van 37° C., binnen de zes uur geen ontkleuring plaats, dan mag men aannemen, dat geen kans op rotting in het water meer bestaat. Naarmate meer zwavelwaterstof aanwezig is, des te sneller wordt het methyleenblauw in een kleurlooze verbinding (leucobase) omgezet.

3. *Bacteriologische werkwijzen.*

Om de verhouding van verschillende micro-organismen, op één bepaald oogenblik in het tankwater aanwezig, vast te leggen, werden de entingen, voor de verschillende bepalingen ongeveer gelijktijdig verricht. Daartoe werden eerst op de gewone wijze van het tankwater verdunningen van 0.1 tot en met 0.00001 (honderdduizendste) gemaakt. De voorzorgen waren genomen om, zoodra de verdunningen gereed waren, in de verschillende media te kunnen enten.

Wordt in het vervolg gesproken van een bepaalden „titer", dan wordt daarmede bedoeld, dat het genoemde organisme in een bepaalde verdunning van de onderzochte vloeistof, door de aankweekingsproef nog aangetoond kon worden; bijvoorbeeld: colititer 100, wil zeggen: bij de verdunning op één honderdste was de colibacil met de aankweekingsmethode van

Eijkman nog aan te toonen. Dus per cc. tankwater waren minstens 100 colibacillen aanwezig, maar minder dan 1000 exemplaren.

Totaal aantal kiemen.

Om dit te bepalen, werden twee gelatineplaten gegoten, die ieder 0.1 cc. van de sterkste verdunning bevatten. Deze platen werden gedurende 4 × 24 uur bij kamertemperatuur (± 16° C.) in diffuus daglicht geplaatst. Daarna werden de opgekomen kolonies geteld, en als er verschil in aantal bestond, het gemiddelde der twee platen genomen. Door herhaalde bepalingen te doen, bleek, dat deze methode betrouwbaar genoeg was, om een inzicht te verkrijgen in het totaal aantal kiemen, die zich op de voedingsgelatine lieten kweeken.

Colititer.

De opsporing van het aantal colibacillen, geschiedde volgens de methode, die Eijkman daarvoor heeft aangegeven. Van de verschillende verdunningen werd 1 cc. in een gistingskolfje, gevuld met versch bereide vloeistof van Eijkman, gepipetteerd. Eijkman plaatste oorspronkelijk de geënte kolfjes in een broedstoof, waarin een temperatuur heerschte van 46° C. Deze grenstemperatuur, waarbij colibacillen zich nog kunnen ontwikkelen, mag niet overschreden worden, want „overschrijding is uit den booze."

Daar nu de proef van Eijkman bedoeld is als aankweekingsproef, werden bij mijn proeven de geënte gistingskolfjes in een broedstoof van 42° C. geplaatst. Hierin bleven de kolven 2 × 24 uur staan. Daarna werden twee druppels vloeistof uit de kolven, waar bovenin zich gas ontwikkeld had, op den voedingsbodem van Endo uitgestreken. Ontwikkelden zich hierop kolonies, die den bekenden metaalglans vertoonden, dan werd aangenomen, dat de gasontwikkeling door colibacillen was veroorzaakt. Ter contrôle werden tevens twee druppels, uit kolven waarin geen gasontwikkeling meer had plaats gevonden, op Endoplaten uitgezaaid.

Bij al mijn proeven is gebleken. dat uit alle kolven, waarin gas was gevormd, colibacillen waren te kweeken, terwijl uit de kolven, waarin geen gasontwikkeling meer was ontstaan, geen kolonies op de platen van Endo groeiden, die een metaalglans te voorschijn riepen.

„Proteus"-titer.

Ter aankweeking van Proteusbacillen, werd 0.1 cc. der verschillende verdunningen, onder in het condensatiewater van schuine agarbuisjes geënt.

Zooals bekend, verstaat de zeer bewegelijke Proteusbacil de kunst, om binnen 24 uur, tegen de voedingsagar opklimmend, den bovenrand van den voedingsbodem te bereiken en daar een karakteristieke gekartelde lijn te vormen. Van deze allerhoogst geklommen kolonies werd verder het gedrag bepaald ten opzichte van gelatinevervloeiing in steekcultuur, tegenover de kleuring volgens Gram, en tegenover indolvorming, terwijl bovendien een suspensie in een hangenden druppel werd bekeken; dit om mij van de bewegelijkheid te overtuigen.

Bij alle, op bovengenoemde wijzen onderzochte, snel klimmende kolonies, werd het volgende vastgesteld: Sterke bewegelijkheid, geen indolvorming, geen gelatinevervloeiing na 2 × 24 uur. Na de kleuring volgens Gram bleek het, dat een deel der slanke staafjes rood gekleurd waren, terwijl de overige een rood-blauwe tint aangenomen hadden, doch niet de donkerblauwe gelijkmatige kleur, die geeischt wordt van bacteriën, die tot de Gram-positieve worden gerekend.

Tegen mijn verwachting, is het mij dus niet gelukt volkomen typische Proteusbacillen te kweeken, daar geen der door mij onderzochte organismen alle typische eigenschappen van Proteus vulgaris bezat; gemakshalve wil ik in de volgende tekst de uitdrukking „Proteus"-titer behouden.

Anaërobentiter.

Behalve Colititer en „Proteus"titer, heb ik ook getracht, tot

het verkrijgen van een inzicht van den anaëroben toestand van de proefseptictank een anaërobentiter te bepalen.

Het is bekend, dat in vrijwel alle vervuild afvalwater, een sporenvormend organisme voorkomt, n.l. B. enteritidis sporogenes. Deze bacterie kan, in zuurstofvrije omgeving, melk tot stremming brengen. Van deze eigenschap werd bij het bepalen van den anaërobentiter gebruik gemaakt. Daartoe ging ik als volgt te werk:

In reageerbuisjes werd ongeveer 10 cc. rauwe melk gegoten, waarna de melk gedurende 1½ uur bij 140° C. werd gesteriliseerd. De versch gesteriliseerde melk werd nu met 1 cc. van de verschillende verdunningen geënt, daarna in een waterbad, bij een temperatuur van 80° C., gedurende 15 minuten geplaatst, om de vegetatieve vormen, in het water aanwezig, te dooden. De aldus behandelde buisjes werden, nadat zij afgekoeld waren, in een zuurstofvrije omgeving geplaatst, en gedurende 2 × 24 uur bij 37° C. bebroed. Een buisje, dat alleen melk bevatte, werd als contrôle bij de andere geplaatst. Om een zuurstofvrije omgeving te verkrijgen, werd de methode, die A. Klein heeft aangegeven, gevolgd. Nadat de buisjes 2 × 24 uur in de stoof hadden gestaan, werd uit het buisje, waarin bij de sterkste verdunning van het tankwater, nog stremming was opgetreden, een weinig wei genomen en dit nader onderzocht in den hangenden druppel. Bovendien werd een Gram-preparaat gemaakt. Eveneens werd een Gram-preparaat gemaakt van de melk, die niet gecoaguleerd was. Daar na een reeks van waarnemingen was gebleken, dat de stremming veroorzaakt werd door een organisme, dat door zijn morphologische eigenschappen beantwoordde aan die van B. enteritidis sporogenes, werd bij de latere proefnemingen volstaan, met te letten op het al of niet gestremd zijn der melk: werd stremming waargenomen, dan werd zij toegeschreven aan de aanwezigheid van den anaëroben B. enteritidis sporogenes.

Later vond ik de litteratuur, dat ook Houston zich van een dergelijke werkwijze had bediend.

VI. De proefseptictank chemisch en bacteriologisch onderzocht, in en buiten werking.

Allereerst heb ik naar den inhoud van de tank, die het vorige najaar sinds eenigen tijd buiten werking was, een biologisch en chemisch onderzoek ingesteld, en tevens den invloed er van op pathogene darmbacteriën nagegaan. Daarna werd de tank in werking gesteld, en tenslotte opnieuw, thans onder toevoer van lucht, buiten werking gesteld.

Het in werking stellen geschiedde volgens de aanwijzigen en gegevens van Clemesha: de tank, die een inhoud heeft van ruim 50 L., werd ingericht voor de verwerking van de helft der faeces van één persoon. Elken morgen werd ongeveer 80 G. faeces van een volwassen persoon in de inlaat gelaten; gedurende 24 uur kon 12.5 L. spoelwater in den vorm van leidingwater in den „gritchamber" druppelen.

Door den toevoer met een klem te regelen, werd voor een doorstroomingstijd van 3 dagen gezorgd. De uitlaat werd zóó geplaatst, dat de tank steeds 37.5 L. bevatte.

1. *De proefseptictank in werking.*

Den 29sten Februari werd de tank in werking gesteld. De eerste chemische bepalingen werden den 4en Maart gedaan; in den loop van die week werden de eerste bacteriologische gegevens verzameld. Daarna werden geregeld iedere week deze proeven herhaald, tot de eerste dagen in Mei, zoodat in het geheel zeven waarnemingen werden gedaan. Tusschen de twee op elkaar volgende uitkomsten, die ik hier meedeel, ligt dus een periode van één week.

Het effluent, dat de werkende tank leverde, was lichtbruin,

van kleur, riekte faecaal, bevatte zeer weinig vaste bestanddeelen, en was helder. Bleef echter de vloeistof eenigen tijd aan de lucht blootgesteld, dan werd zij ondoorschijnend.

Scheikundige bepalingen.

Ammoniakgehalte per L.: 70 m.G. — 90 m.G. — 110 m.G. — 140 m.G. — 140 m.G. — 120 m.G. — 140 m.G.

We zien dus het ammoniakgehalte geleidelijk stijgen, om niet hooger te komen dan 140 m.G. per L.

Zuurstofgehalte: Zuurstof was reeds bij de eerste bepaling niet aan te toonen. Ook bij de verdere bepalingen waren de vondsten negatief.

Methyleenblauwproef: In de eerste drie proeven vond ik: na ± 5 uur ontkleuring, na ± $^1/_2$ uur ontkleuring, na ± 5 minuten ontkleuring.

Bij de vier laatste bepalingen, kon de ontkleuring bijna onmiddellijk nadat de proeffleschjes in de broedstoof waren gezet, waargenomen worden.

Deze uitkomsten geven een geleidelijke stijging van reduceerende stoffen, met name zwavelwaterstof, te zien.

Bacteriologische bepalingen.

Totaal aantal kiemen per cc.

Op de gelatineplaten, die met één millioenste cc. tankwater geënt waren, kwamen nog zooveel kolonies op, dat het tellen hiervan niet wel doenlijk was. Bovendien was een aantal platen reeds vervloeid, zoodat contrôle onmogelijk was. Het tankwater zou dus nog sterker verdund dienen te worden, wilde ik in staat zijn de kolonies te tellen.

De telling bleek bij een verdunning van een milliard pas mogelijk, maar daar de twee platen te groote verschillen ten opzichte van het aantal opgekomen kiemen opleverden, werden verdere bepalingen in deze richting achterwege gelaten.

Colititer. Deze zijn de gevonden cijfers:

1000 — 1000 — 100.000 — 100.000 — 1000.000 of meer,
100.000 — 1000.000 of meer.

Het aantal colibacillen is aanmerkelijk gestegen. Bij een verdunning van één millioenste, die gemaakt werd, toen het bleek, dat de sterkste verdunning nog een positieve „Eijkman" gaf, werd het gelaten: er werden geen sterkere verdunningen gemaakt.

Was de uitslag van de proef met 1 cc. van de verdunning 1 op 1000.000 nog positief, dan gaf ik dit bij den colititer aan met: 1000.000 of meer.

„Proteus"-titer: De uitkomsten van deze bepalingen gaven aanvankelijk eenige onregelmatigheden te zien.

Bij de eerste reeks waren alle agarbuisjes, behalve dat waarin één honderdduizendste cc. tankwater was geënt, tot boven aan met een vlies bedekt; slechts in het buisje dat één honderdste cc. tankwater bevatte, waren echter „Proteus"-bacillen zooals ik die op blz. 22 definieerde, de gekartelde rand van de gegroeide cultuur in de buisjes met één duizendste en één tienduizendste cc. tankwater bestond uit grove, plompe, Gram-positieve staafjes.

De tweede reeks gaf een titer van 1000 per cc.

De derde serie vertoonde weer de moeilijkheden van de eerste reeks; maar bij nader onderzoek mocht de „proteus"-titer op 10 worden gesteld.

Het vierde onderzoek leverde een titer van 10.

In de vijfde, zesde en zevende week vond ik achtereenvolgens een titer van 10, 100, en 10.

We zien hier dus een afneming van het aantal proteusbacillen in het effluent van de in werking zijnde septictank.

Anaërobentiter. Deze resultaten geven een zeer duidelijk beeld van de stijging van den vertegenwoordiger der anaërobionten in een tank, die, aanvankelijk verwaarloosd, langzamerhand rijp wordt, met andere woorden, waarin het anaërobische rottingsproces zich aan het ontplooien is.

Terwijl in de eerste week de reactie bij 0.1 cc. positief was, vond ik in de tweede week reeds een titer van 1000; in de volgende vijf weken was de titer tot 10.000 opgeloopen.

TABEL I.

Chemische en bacteriologische bepalingen van de proefseptictank na het in werking zetten op 29 Februari.

AARD DER BEPALING	DATUM DER BEPALING						
	4—11 Maart	11—18 Maart	18—25 Maart	25 Mrt.—1 April	1—8 April	8—15 April	15—22 April
NH_3 m.G. per L.	70	90	110	140	140	120	140
O_2 cc. per L.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Methyleenblauw-proef positief na:	5 uur	30 min.	± 5 min.	± 3 min.	± 3 min.	± 3 min.	± 3 min.
Aantal kiemen per cc.	∾	∾	∾	∾	∾	∾	∾
Colititer	1000	1000	100.000	100.000	1000.000 of meer	100.000	1000.000 of meer
„Proteus"titer	100	1000	10	10	10	100	10
Anaërobentiter	10	1000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000

In vorenstaande tabel I zijn de resultaten, gevonden bij het onderzoek van de werkende tank, nog eens samengevat.

2. *De proefseptictank buiten werking.*

Toen een begin werd gemaakt met de proeven, was de in het vorige hoofdstuk beschreven proeftank, sedert eenige maanden buiten werking.

Zij stond voor ongeveer een derde gevuld; er was een sliblaag van eenige centimeters dikte, door het glas waar te nemen. Boven op de vloeibare laag dreven eenige ingedroogde faecaliën, maar van een aanééngesloten drijflaag was geen sprake. De overigens heldere vloeistof, was bouillonkleurig, en bevatte grovere en kleinere zwevende bestanddeelen. Er was geen faecale geur aan de vloeistof waar te nemen. Tegen de wanden van de tank vertoonde zich een groene aanslag, veroorzaakt door een welige algengroei.

Het zou nu interessant zijn, de zich nog in de tank bevindende vloeistof, bacteriologisch en scheikundig vast te leggen, haar gedrag tegenover pathogene darmbacteriën na te gaan en deze eigenschappen te vergelijken met die van de vloeistof, geleverd door de tank in volle werking.

Allereerst werden dan de genoemde scheikundige en bacteriologische bepalingen verricht van de vloeistof, afkomstig van de verwaarloosde tank.

Scheikundige bepalingen.

Daar niet verwacht kon worden, dat de scheikundige samenstelling in den loop van het onderzoek nog zou veranderen, werden de chemische analysen tweemaal in duplo uitgevoerd.

Deze leverden de volgende uitkomsten:

Ammoniakgehalte per L.: 60 mG. — 60 mG. — 60 mG. — 60 mG.

Zuurstofgehalte per L.: 2.4 cc. — 2.4 cc. — 2.6 cc. — 2.6 cc.

Methyleenblauwproef: Deze viel viermaal negatief uit.

Bacteriologische bepalingen.

Deze werden eveneens viermaal verricht, maar met eenige

tijdsruimte tusschen iedere reeks. Zetten we de uitkomsten der vier bepalingen naast elkaar, dan vinden we:

Totaal aantal kiemen per cc.:

1.000.000, 2.000.000, 1.500.000, 1.500.000

Colititer: 100 — 1000 — 100 — 100.

„Proteus"titer: 100 — 100 — 1000 — 100.

Anaërobentiter. De proef viel met 1 cc. negatief uit; toen echter 3 cc. tankwater bij de melk werd gevoegd, trad er stremming der melk op. Dit toch mag geen verwondering wekken, daar uit de scheikundige bepalingen gebleken was, dat zuurstof in het water aanwezig was.

Bovendien is uit de resultaten te lezen, dat betrekkelijk weinig colibacillen in het water van de verwaarloosde tank aanwezig waren.

Uit de methyleenblauwproef, die 3×24 uur was doorgezet, volgt, dat het water uitgerot was. Ter vergelijking was een proef ingesteld met zeer verontreinigd grachtwater, dat in staat bleek, het methyleenblauw in 2 uur te ontkleuren.

De twee volgende tabellen geven een overzicht over de uitkomsten der chemische en bacteriologische bepalingen uitgevoerd met de vloeistof uit de verwaarloosde tank.

TABEL II.

Chemische bepalingen van de vloeistof uit de verwaarloosde proefseptictank.

AARD DER BEPALING	DATUM DER BEPALING			
	4-1-'24		7-1-'24	
NH_3 m.G. per L.	60	60	60	60
O_2 cc. per L.	2.4	2.4	2.6	2.6
Methyleenblauwproef:	negatief	negatief	negatief	negatief

TABEL III.

Bacteriologische bepalingen van de vloeistof uit de verwaarloosde proefseptictank.

AARD DER BEPALING	DATUM DER BEPALING			
	8-1-'24	14-1-'24	25-1-'24	4-2-'24
Aantal kiemen per cc.	1.000.000	2.000.000	1.500.000	1.500.000
Colititer	100	1000	100	100
„Proteus"-titer	100	100	1000	100
Anaërobentiter	met 3 cc. positief	met 3 cc. positief	met 3 cc. positief	met 3 cc. positief

VII. Eigen proeven over pathogene darmbacteriën en septictank.

De pathogene darmbacteriën, die voor mijn proeven gebruikt werden, waren typhusbacillen, dysenteriebacillen van het toxische type, en choleravibrionen. Steeds werd gewerkt met 24 uur oude culturen van stammen, die zoowel biochemisch als serologisch de typische eigenschappen vertoonden van typhusbacillen, dysenteriebacillen van het toxische type en choleravibrionen.

Als factoren, die eventueel een doodende werking zouden kunnen uitoefenen, werden onder de oogen gezien:

1. de scheikundige samenstelling der vloeistof;
2. de waterstofionenconcentratie der vloeistof;
3. protozoën.

1. *De invloed der chemische samenstelling van de vloeistof.*

Onder het litteratuuroverzicht, is reeds gewezen op de meening van sommige onderzoekers, als zou de scheikundige samenstelling van de tankvloeistof, waaronder tevens begrepen de stofwisselingsprodukten der rottingsbacteriën, een schadelijken invloed hebben op pathogene darmbacteriën.

Dit heb ik nog eens nader onderzocht en wel op de volgende manier: Effluent werd door een filter van Berkefeld gefiltreerd en steriel opgevangen. Door de filtratie wordt de vloeistof vrij van bacteriën, maar hun stofwisselingsprodukten blijven in de vloeistof achter; bovendien blijft de samenstelling der vloeistof onveranderd. In drie steriele kolfjes werd, ieder afzonderlijk, 100 cc. gefiltreerd tankwater gepipetteerd. Om te zien of steriel gewerkt was, werd 1 cc. uit ieder kolfje op twee agarplaten

uitgestreken. Het bleek, dat de gebruikte filters geen kiemen hadden doorgelaten en dat bij het pipetteeren geen bacteriën in de vloeistof waren geraakt.

Vervolgens werd het eerste kolfje geënt met een platinaoogje van een 24 uur oude typhuscultuur, het tweede met een oogje van 24 uur oude dysenteriecultuur en het derde met een oogje van een 24 uur oude choleracultuur. Ter vergelijking werd in drie andere steriele kolfjes, ieder 100 cc. steriele physiologische zoutsolutie gepipetteerd, en deze geënt met een oogje van dezelfde cultuur typhusbacillen, resp. dysenteriebacillen en choleravibrionen.

Met het oog op de telling werden dunne suspensies gemaakt.

Terstond na de enting werd het aantal aanwezige kiemen in de zes kolven bepaald, door uit iedere kolf, 2 maal 0.1 cc. vloeistof te pipetteeren, en iedere 0.1 cc. op een agarplaat uit te strijken. De platen werden in een broedstoof van 37° C. geplaatst en het aantal opgekomen kolonies na 24 uur geteld.

Van de twee platen, die uit hetzelfde kolfje geënt waren, werd het gemiddelde der opgekomen kolonies genomen.

Om na te gaan of de gefiltreerde vloeistof inderdaad een nadeeligen of doodelijken invloed op de geënte bacteriën had, werd het aantal op bovengenoemde wijze nogmaals bepaald op den 3en dag en op den 10en dag na de enting.

Deze proef werd driemaal uitgevoerd, met vloeistof van de tank buiten werking en driemaal met effluent van de tank in volle werking.

Uit mijn proeven is gebleken, dat tankvloeistof, gefiltreerd door een filter van Berkefeld, geen nadeeliger invloed heeft op typhusbacillen, dysenteriebacillen en choleravibrionen dan een steriele physiologische keukenzoutoplossing.

Hiernevens geeft de tabel IV de verkregen uitkomsten weer.

2. *De invloed der waterionenconcentratie van de vloeistof.*

Deze werd colorimetrisch bepaald met phenolrood, ten opzichte van standaardoplossing van bekende P_H. De P_H dezer buffervloeistoffen waren electrometrisch vastgesteld.

TABEL IV.

De invloed van de chemische samenstelling der tankvloeistof vergeleken met dien van physiologische zoutsolutie op pathogene darmbacteriën.

No. DER BEPALING	AANTAL BACTERIËN PER CC.	SUSPENSIE IN PHYSIOL. ZOUTSOLUTIE			SUSPENSIE IN VLOEISTOF UIT VERWAARL. TANK			SUSPENSIE IN VLOEISTOF UIT WERKENDE TANK		
		dag der enting 8-II	op 11-II	op 18-II	dag der enting 8-II	op 11-II	op 18-II	dag der enting 10-III	op 13-III	op 20-III
I.	Typhus	1350	1100	980	730	700	540	480	440	290
	Cholera	1690	1300	890	310	320	160	670	540	320
	Dysenterie	1290	1080	1050	960	840	720	1880	1780	1540
		dag der enting 12-II	op 15-II	op 22-II	dag der enting 12-II	op 15-II	op 22-II	dag der enting 22-III	op 25-III	op 1-IV
II.	Typhus	900	1250	850	260	270	230	1680	1540	1230
	Dysenterie	590	630	410	670	540	530	1480	1500	1190
	Cholera	3460	3000	2640	1140	1010	910	280	340	180
		dag der enting 16-II	op 19-II	op 26-II	dag der enting 16-II	op 19-II	op 26-II	dag der enting 4-IV	op 7-IV	op 14-IV
III.	Typhus	340	420	260	1470	1370	1180	320	360	220
	Dysenterie	850	760	530	580	600	430	290	250	170
	Cholera	480	460	340	360	370	340	910	720	710

De vraag, of in de vloeistof van de proefseptictank een zoodanige waterstofionenconcentratie heerschte, dat zij doodend op pathogene darmbacteriën werkte, is feitelijk reeds beantwoord bij de onderzoekingen over den invloed van de chemische samenstelling. Immers kon ik geen schadelijke inwerking aantoonen. De waterstofiionenconcentratie van de vloeistof der verwaarloosde tank bedroeg: P_H 7.3. De P_H bleef gedurende het onderzoek constant. Ook van de vloeistof uit de werkende tank ging geen doodende werking op pathogene darmbacteriën uit. De P_H, herhaalde malen bepaald, schommelde tusschen 7.3 en 7.7. Geen enkele maal kon een sterkere alcaliniteit aangetoond worden dan die overeenkwam met P_H 7.7.

Uit mijn voorgaande proeven meen ik te mogen besluiten, dat, als in een septictank een waterstofionenconcentratie heerscht, die schommelt tusschen P_H 7.3 en 7.7, geen specifiek doodende werking der vloeistof op typhusbacillen, dysenteriebacillen en choleravibrionen is te verwachten.

Niet altijd echter is de vloeistof in een tank zoo zwak alcalisch. Men mag veeleer aannemen, dat de alcaliniteit aanmerkelijk stijgen kan.

Het is bekend, dat een sterke alcalische omgeving slecht door pathogene darmbacteriën verdragen wordt. Met de mogelijkheid, dat in een rottingskelder een verhoogde alcaliniteit kan voorkomen, werd rekening gehouden en daarom werden proeven aangezet om den invloed na te gaan van tankvloeistof, die kunstmatig sterker alcalisch was gemaakt.

Ongeveer 1 L. effuent van de werkende tank werd door een filter van Berkefeld bacterie-vrij gemaakt. De P_H van de vloeistof bedroeg 7.5. Vervolgens werd 300 cc. geënt met een klein oogje van een 24 oude typhuscultuur en onmiddellijk het aantal geënte bacteriën bepaald. Deze 300 cc. werden gelijkelijk over 3 steriele kolfjes verdeeld. In het eerste kolfje had de vloeistof dus een P_H 7.5. In het tweede werd de P_H door $^1/_{100}$ N. NaOH opgevoerd tot 8.4, in het derde tot 9.3.

Op dezelfde wijze werd 300 cc. geënt met 24 uur oude

dysenteriebacillen en 300 cc. met 24 uur oude choleravibrionen. Ook het aantal geënte dysenteriebacillen en choleravibrionen werd onmiddellijk na de enting bepaald en verder behandeld als de kolfjes, waarin typhusbacillen aanwezig waren.

Om nu te zien of de grootere alcaliniteit invloed had op den levensduur der geënte bacteriën, werd hun aantal in de 9 kolven opnieuw bepaald op den 3en dag, en nogmaals op den 10en dag na de enting.

De resultaten over den invloed van de waterstofionenconcentratie in tankvloeistof samenvattend, meen ik het volgende te mogen aannemen:

1. De oorspronkelijke tankvloeistof doodde de pathogene darmbactariën niet. Na 10 dagen was wel een afneming van het aantal waar te nemen.

2. In de vloeistof (met P_H 8.4, was na 3 dagen het aantal typhusbacillen tot op de helft ongeveer afgenomen, dysenteriebacillen waren in 2 maal 0.1 cc. niet meer aan te toonen, terwijl weinige choleravibrionen nog aanwezig waren. De dysenteriestam, waarmede ik werkte, bleek dus gevoeliger voor het alcalische milieu dan de cholerastam.

Na 10 dagen waren nog verscheidene typhusbacillen aanwezig, dysenteriebacillen en choleravibrionen konden niet meer in 0.2 cc. aangetoond worden.

3. In de kolven met een P_H 9.3, waren na 3 dagen nog typhusbacillen te vinden, terwijl geen dysenteriebacillen en choleravibrionen meer op de geënte platen opkwamen. Na 10 dagen bleven alle platen steriel.

Dezelfde proeven werden nogmaals gedaan met vloeistof, die een oorspronkelijke waterstofionenconcentratie had, overeenkomend met P_H 7.4. De resultaten dezer waarnemingen worden in de gegeven tabel V overzichtelijk gemaakt. In deze tabel zijn de cijfers van het bacteriënaantal in het tankwater met P_H 7.4, duidelijkheidshalve niet opgenomen.

TABEL V.

De invloed van tankvloeistof met verschillende P_H op pathogene darmbacteriën.

No. DER BEPALING	AANTAL BACTERIËN PER CC.	SUSPENSIE IN TANKVOCHT MET P_H 7.5			SUSPENSIE IN TANKVOCHT MET P_H 8.4			SUSPENSIE IN TANKVOCHT MET P_H 9.3		
		dag der enting 2-V	op 5-V	op 12-V	dag der enting 2-V	op 5-V	op 12-V	dag der enting 2-V	op 5-V	op 12-V
I.	Typhus	1150	1110	970	1150	660	215	1150	110	0
	Dysenterie	870	750	470	870	0	0	870	0	0
	Cholera	1160	1090	740	1160	280	0	1160	0	0
		dag der enting 7-V	op 10-V	op 17-V	dag der enting 7-V	op 10-V	op 17-V	dag der enting 7-V	op 10-V	op 17-V
II.	Typhus	690	600	450	690	410	95	690	75	0
	Dysenterie	490	500	320	490	0	0	490	0	0
	Cholera	830	800	710	830	45	0	830	0	0

3. Protozoën.

Bij de beschouwing over het verschijnsel der zelfreiniging is de groote rol, die de protozoën daarbij vervullen, reeds naar voren gebracht. Spelen zij nu ook die voorname rol in septictanks, met andere woorden, is er aanleiding om aan te nemen, dat zij daarin een groot aantal bacteriën tot voedsel opgebruiken, waarbij tevens de mogelijkheid bestaat, dat pathogene darmbacteriën, in de tank geraakt, verslonden worden?

De proeven hiervoor, werden op de volgende wijze ingericht: In steriele physiologische zoutsolutie werd een suspensie gemaakt van 24 uur oude typhusbacillen. In 7 steriele reageerbuizen werd ieder 5 cc. van deze dikke, troebele suspensie gepipetteerd. Bovendien werd in 6 van de 7 buisjes 1 cc. minder of meer verdund tankwater gevoegd en wel als volgt: In het eerste 1 cc. onverdund tankwater, in het 2e 0.1 cc., in het 3e 0.01 cc., in het 4e 0.001 cc., in het 5e 0.0001 cc., in het 6e 0.00001 cc. Het 7e buisje diende als contrôle en bevatte 5 cc. suspensie en 1 cc. steriel water. Eveneens werden suspensies van dysenteriebacillen en choleravibrionen gemaakt, deze afzonderlijk in buisjes gedaan en met verschillende hoeveelheden tankwater geënt. De geënte buisjes werden in rekjes geplaatst en in de tropische kamer bij diffuus daglicht gezet. Dagelijks werd de troebelheid der buisjes met tankwater, vergeleken met die der contrôlebuisjes.

Het is door proeven gebleken, dat protozoën, in een suspensie van bacteriën gebracht, in staat zijn de troebele vloeistof helder te maken, doordat zij de bacteriën eruit wegvreten. De tegenwoordigheid van bacteriën prikkelt de protozoën om zich te deelen, zoodat de vloeistof, waarin aanvankelijk zeer weinig protozoën aanwezig zijn, in korten tijd massa's protozoën kan bevatten.

Door nu tankwater, in een suspensie van typhusbacillen, dysenteriebacillen en choleravibrionen te brengen, kan in de eerste plaats nagegaan worden of in het tankwater protozoën aanwezig zijn, die, als voedsel, deze pathogene darmbacterien opnemen. De afneming der troebelheid in de buisjes zal het bewijs

moeten leveren, dat de protozoën zich met de bovengenoemde gevoed hebben. Door nu de proeven zóó uit te voeren, dat bij de suspensies steeds kleiner hoeveelheden tankwater worden geënt, kan uitgemaakt worden, in welke hoeveelheid tankwater nog minstens 1 protozoë aanwezig was bij de enting. Waren bijv. de suspensies, die 0.1 cc. tankwater bevatten, volkomen helder geworden, terwijl de vloeistof met 0.01 cc. tankwater troebel was gebleven, dan mocht aangenomen worden, dat op het oogenblik der enting in 1 cc. tankwater minstens 10 protozoën aanwezig waren, maar minder dan 100 exemplaren. Dat de clarificatie niet ontstaan was door bezinking der bacteriën werd natuurlijk geregeld gecontroleerd.

Uit het bovenstaande moge blijken, dat ik hier de werkwijze heb toegepast, die Abdul Rivaï aangaf ter bepaling van het aantal aanwezige protozoën in water.

Op den 15en dag na de enting, werd de toestand in de verschillende buisjes beoordeeld en hieruit het aantal protozoën, indien aanwezig, per cc. tankwater, afgeleid. Hierin lag niets willekeurigs, daar bij oriëntatie proeven gebleken was, dat, àls er clarificatie door reiniging der protozoën plaats vond, dit binnen de 14 dagen geschiedde.

Zoodra de inhoud in één der buisjes geheel helder was geworden, werden eenige druppels daarvan microscopisch onderzocht, op aanwezigheid van protozoën. Na den 15en dag werden ook de niet geheel opgehelderde buisjes aldus bekeken.

Op bovenbeschreven wijze, werd van het water, dat in de verwaarloosde tank aanwezig was, viermaal de protozoëntiter bepaald. Het bleek, dat alle buisjes, met 0.01 cc. tankwater geënt, volkomen helder waren geworden. Eén oogje van den inhoud was reeds voldoende om protozoën onder het microscoop te zien.

Verscheidene buisjes, waarin minder tankwater zat, bleken min of meer opgehelderd te zijn in vergelijking met den inhoud van het contrôlebuisje. Het lukte mij echter nooit, zelfs in grootere hoeveelheden vloeistof, protozoën te zien te krijgen. Ik meen dan ook, dat deze opheldering niet door protozoën werking

mag worden verklaard. Van bezinking was evenmin sprake.

In twee gevallen waren de contrôles helder geworden: onderin de buisjes lag geen bezinksel. De oorzaak van het helder worden van den inhoud dezer twee contrôlebuisjes heb ik niet kunnen vinden. Ook het microscopisch onderzoek gaf mij geen uitsluitsel.

Aan de hand van mijn aanteekeningen, wil ik mijn waarnemingen, die ik bij de 4 reeksen proeven deed, mededeelen.

Eerste reeks. Deze reeks, begonnen op 20-12-'23, geeft geen aanleiding tot opmerkingen. Reeds op den tweeden dag na de enting trad klaring op in het buisje, dat met cholera-vibrionen en 1 cc. tankwater was geënt. De buisjes met typhus-bacillen bleven het langst troebel, maar op 4-1-'24 waren alle buisjes, die 1 cc., 0.1 cc., en 0.01 cc. vocht uit de verwaarloosde tank bevatten, volkomen helder geworden, terwijl geen bezinksel onder in de buisjes aanwezig was.

Tweede reeks. Deze reeks gaf eenige bijzonderheden te zien. Op 15-1-'24 aangezet, vertoonde deze reeks op den tweeden dag na de enting het eigenaardige, dat de drie buisjes, die ieder 0.01 cc. tankvocht bevatten, reeds aanmerkelijk helder waren geworden, hoewel nog niet volkomen helder, terwijl de buisjes die 1 cc. tankwater bevatten, geen spoor van helder worden vertoonden.

Op 21-1-'24 waren echter alle buisjes met 1 cc., 0.1 cc. en 0.01 cc. tankvocht volkomen helder geworden. Tot op den laatsten dag, 29-1-'24, kwam geen verandering in den toestand.

Alleen zij nog medegedeeld, dat de contrôle der typhus-suspensie, door een niet opgehelderde oorzaak, volkomen geclarificeerd was.

Derde reeks. Nadat de buisjes voor deze reeks op 31-1-'24 geënt waren, was de opheldering het eerst merkbaar in de suspensie met dysenteriebacillen, die 0.1 cc. tankvocht bevatte daarna in het buisje, dat 1 cc. tankvocht bevatte. De suspensie met cholera-vibrionen vertoonde het laatst opheldering, maar op 15-1-'24 waren alle buisjes, die 0.01 cc. en meer tankwater bevatten, geheel helder geworden. Bovendien was de contrôle

met de suspensie choleravibrionen door onbekende oorzaak helder geworden.

Vierde reeks. Hierbij vond ik het volgende:

Op 6-2-'24 was het buisje met typhusbacillen en 1 cc. tankwater helder geworden; alle overige buisjes waren nog troebel. Acht dagen na de enting, op 10-2-'24 vertoonden zich teekenen van helder worden in de suspensies met dysenteriebacillen en choleravibrionen, terwijl op 16-2-'24 alle buisjes, die 1 cc., 0.1 cc. en 0.01 cc. tankwater bevatten volkomen opgeklaard waren. De reeks was 2-2-'24 begonnen.

Uit de uitkomsten van mijn proeven meen ik te mogen besluiten, dat de protozoëntiter van het water der verwaarloosde tank op 100 mocht worden gesteld, met andere woorden, dat 1 cc. tankvocht uit de verwaarloosde tank minstens 100, maar minder dan 1000 protozoën bevatte. Deze protozoën bleken pathogene darmbacteriën op te ruimen, zoodat hunne aanwezigheid het zeer waarschijnlijk maakte, dat pathogene darmbacteriën een verblijf in de verwaarloosde tank niet zouden overleven.

Dezelfde proeven heb ik verricht met effluent van de werkende tank.

Uit de vier reeksen van waarnemingen, die gedaan werden tusschen 24-3-'24 en 9-4-'24, bleek, dat de troebele suspensies troebel bleven, met andere woorden, dat geen „zelfreiniging" plaats vond.

Uit iedere reeks werd de inhoud van eenige buisjes gecentrifugeerd en het centrifugaat microscopisch op aanwezigheid van protozoën onderzocht. Geen enkele maal heb ik protozoën kunnen vinden. Bovendien heb ik in suspensies grootere hoeveelheden tankwater geënt, tot 5 cc. toe, maar ook hierin kon ik geen clarificatie waarnemen. Op grond hiervan meen ik de aanwezigheid van protozoën in de werkzame zône van een septictank te moeten ontkennen. Hierdoor is tevens hun invloed op het lot van pathogene darmbacteriën in een septictank uitgesloten.

Dat protozoën eveneel hun reinigende werking in effluent, wanneer zij daar met opzet ingebracht zijn, kunnen vertoonen, bewijzen de volgende proeven.

Nadat wat vloeistof uit de afloop van de tank was opgevangen, werd zij eenige dagen in een bolf aan de lucht blootgesteld en dagelijks eenige malen geschud. Nadat de vloeistof gedurende 5 dagen zoo was behandeld, werd een derde deel ervan geënt met typhusbacillen, een ander derde deel met dysenteriebacillen en de rest met choleravibrionen. Deze suspensies werden ieder over 7 buisjes verdeeld, op de wijze, zooals dit bij de vorige proeven is beschreven.

Nadat te voren de protozoëntiter was bepaald van vijverwater, welk water minstens 1000, maar minder dan 10.000 protozoën per cc. bleek te bevatten, werd op 22-4-'24 van dit protozoën houdend water, afnemende hoeveelheden bij de suspensies gepipetteerd, zooals dit ook geschied was bij de proeven met het tankwater. In 6 buisjes kwamen dus bij de verschillende suspenties afnemende hoeveelheden vijverwater, in het 7e buisje, de contróle, werd geen vijverwater gedaan.

Na 15 dagen, dus op 7-5-'24, bleek, dat alle buisjes, die 0.001 cc. en meer vijverwater bevatten, volkomen helder waren geworden.

Een tweede reeks proeven, begonnen op 24-4-'24, en een derde, begonnen op 29-4-'24, in deze richting gedaan, gaven als resultaat, dat de buisjes, die 0.01 cc. vijverwater bevatten, volkomen geclarificeerd waren. Deze drie reeksen geven geen aanleiding tot nadere opmerkingen. Ook hier kon ik, evenals in de reeksen met vocht uit de verwaarloosde tank, onregelmatigheden — als ik het zoo noemen mag — waarnemen. Hiermede wil ik dus zeggen, dat volkomen helder worden soms eerder plaats vond in buisjes met minder vijverwater dan in buisjes met meer vijverwater, die pas later geheel ophelderden. Alle contróles bleven volkomen troebel.

Door deze laatste proeven is in het licht gesteld, dat in sterk laagzaal verontreinigd water wel degelijk „zelfreiniging" plaats vinden kan, mits protozoën aanwezig zijn.

Langs indirecten weg wordt hierdoor de afwezigheid van protozoën in de rottende laag van een goedwerkende tank bewezen; en hierbij in aansluiting, dat pathogene darmbacteriën van de kant der protozoën dus in die laag niet bedreigd worden.

VIII. Proeven met vloeistof der proefseptictank na doorvoering van lucht.

Toen de septictanks aangewend werden ter zuivering van afvalstoffen, bleek weldra, dat het effluent, nog afgezien van zijn bacteriologische samenstelling, niet zonder meer in open wateren mocht worden geloosd, omdat het instaat was in rotting over te gaan. Daarom werd aan het anaërobe proces het aërobe geschakeld: de effluents werden over oxydatiebedden gevoerd, waar de zuurstof uit de lucht de bovengenoemde verbindingen kon omzetten.

Het voorafgegane rottingsproces bleek echter het nakomende oxydatieproces eerder te bemoeilijken dan te vergemakkelijken. Daarom kwam de gedachte op om het afvalwater in groote bakken op te vangen en zonder vóórbewerking aan het oxydatieproces te onderwerpen, en wel door lucht in fijn verdeelden toestand door de vloeistof te voeren.

Dit in de laatste jaren op den voorgrond getreden systeem ter reiniging van afvalstoffen en afvalwater is dat door middel van z.g. „activated sludge" („boue activée" der Franschen). Aanvankelijk verkreeg men geen resultaten; een zeer klein deel der organische stoffen werd door oxydatie verteerd en de zwavelwaterstof verdween, terwijl het ammoniak-gehalte in het geluchte water vrijwel op dezelfde hoogte bleef. Het bleek echter, dat, indien de luchting of „aëratie" maar lang genoeg werd volgehouden, de ammoniak op een gegeven oogenblik vrij plotseling uit het water verdween. Verving men dit geluchte water door ander afvalwater, maar liet men het slib in de bak, dan nam men waar, dat in de tegenwoordigheid van dit slib het ammoniak en de organische stoffen veel spoediger door

luchten verdwenen dan bij de eerste luchting: het slib was „geactiveerd", het was in staat ammoniak met behulp van zuurstof in zeer korten tijd te doen verdwijnen. Dit proces komt tot stand door biologische omzettingen.

Over de chemische en biologische samenstelling van door „activated sludge" gereinigd afvalwater, zijn reeds talrijke onderzoekingen bekend. De resultaten dezer onderzoekingen hebben aan het licht gebracht, dat afvalwater, dat door luchting was gereinigd, zeer veel protozoën bevat, en dat het aantal bacteriën daarin sterk is afgenomen. Amerikaansche en Engelsche onderzoekers deelen zelfs mede, dat zij een reductie van 99 % der bacteriën hebben waargenomen.

Courmont en Rochaix hebben het gedrag van pathogene darmbacteriën in rioolwater, dat met en zonder „boue activée" gelucht werd, nagegaan. Uit hunne proeven bleek, dat typhus- en paratyphusbacillen uit rioolwater, al of niet gelucht, na 4 dagen waren verdwenen. Ook de aanwezigheid van „boue activée" had geen merkbaar nadeeligen invloed op den levensduur dezer bacteriën. Werd echter vooraf het rioolwater en het slib gesteriliseerd, dan troffen de onderzoekers na 14 dagen nog geënte choleravibrionen in het water aan. De bacillen der typhus-paratyphusgroep waren na 40 dagen nog aantoonbaar

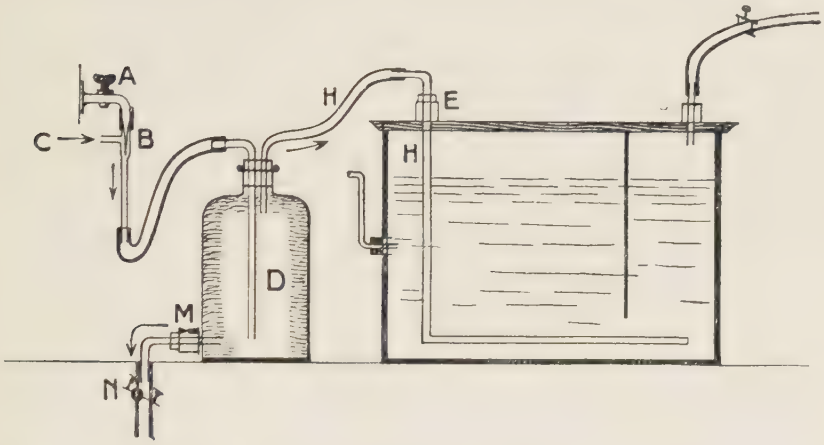
Uit hunne proeven trekken zij deze conclusie:

„La disparation tardive des B. typhiques et paratyphiques et celle du V. cholérique ne semble pas influencée par l'aëration ou la présence des boues activées; elle semble avoir comme facteur essentiel la concurrence vitale des autres germes."

In verband nu met deze onderzoekingen en met het verschijnsel, dat ik zelf heb waargenomen, n.l. dat in tankvloeistof, die zuurstof bevatte, opruiming van bacteriën plaats vond, zou het van belang zijn, lucht door de vloeistof in de werkende tank te voeren en het gedrag van pathogene darmbacteriën in deze vloeistof na te gaan.

1. *De werkwijze, volgens welke de proefseptictank gelucht werd.*

Om de tank te luchten, werd zij in verbinding gesteld met een waterstraalpomp (B) (zie schematische teekening). De opening



(E) in de deksel, die aanvankelijk met het waschfleschje in verbinding stond, werd nu gebruikt voor de glazenbuis (H), die de lucht moest toevoeren. Deze buis liep in de sliblaag tot in de „gritchamber" door. Door de waterkraan (A) open te zetten, liep er water in de flesch (D); tegelijkertijd werd lucht binnengezogen door C. De lucht in de flesch kwam onder druk en vond een uitweg door de glazenbuis (H) naar de tank. Met een klem (N) kon de afvoer uit de uitlaat (M) der flesch geregeld worden.

De toevoer van faeces en spoelwater werd op de in hoofdstuk IV beschreven wijze geregeld.

2. *Pathogene darmbacteriën in de vloeistof der „gelucht" proefseptictank.*

De proeven, die ik nam, om het gedrag van pathogene darmbacteriën in vloeistof van de „geluchte" proefseptictank na te gaan, heb ik beperkt tot het onderzoek op de aanwezigheid van protozoën in die vloeistof.

Daartoe werden op de beschreven wijze suspensies van typhusbacillen, dysenteriebacillen en choleravibrionen in steriele physiologische zoutsolutie gemaakt. Van de verschillende suspensies werden ieder 5 cc. in 6 steriele reageerbuisjes gepipetteerd; aan ieder buisje werd bovendien minder of meer verdund tankwater toegevoegd, zoodat het 1e buisje 1 cc. onverdund tankvocht, het 2e 0.1 cc., het 3e 0.01 cc., het 4e 0.001 cc., het 5e 0.0001 cc., en het 6e 0.00001 cc. tankvocht bevatte. Het 7e buisje bevatte 5 cc. suspensie en 1 cc. steriel water. In ieder buisje was dus in het geheel 6 cc. vloeistof aanwezig.

In het geheel entte ik drie reeksen op bovengenoemde wijze, nadat door de tank van 19-5-'24 tot 26-5-'24 lucht was doorgeblazen.

Eerste reeks. Deze werd begonnen op 26-5-'24 en het resultaat ervan beoordeeld op 10-6-'24. Nadat reeds op den 3en dag na de enting volkomen opheldering had plaats gevonden in de buisjes, die 1 cc. onverdund tankvocht bevatten, werd op den 4en dag na de enting het buisje, dat 0.001 cc. tankwater en dysenteriebacillen bevatte, volkomen helder. Op den 5en dag na de enting was ook het buisje met 0.0001 cc. tankwater volkomen helder geworden, terwijl de opheldering in de buisjes met typhusbacillen en choleravibrionen slechts te zien was in de buisjes met een verdunning van 1 op 1000. De contrôle der typhussuspensie was helder geworden door bezinking der bacteriën.

Tweede reeks. Deze reeks werd ingesteld op 28-5-'24 en beoordeeld op 12-6-'24.

Reeds op den 5en dag waren alle buisjes, die 0.0001 cc. en meer tankvocht bevatten, geheel helder geworden. Tot op den laatsten dag bleef de toestand onveranderd. Het was nu in het contrôle-buisje der cholerasuspensie dat de vibrionen op den bodem waren gezonken, zoodat dit contrôle-buisje helder was geworden.

Derde reeks. Ingesteld op 30-5-'24 en beoordeeld op 14-6-'24 gaf weer een protozoëntiter van 10.000. Hier kwam ook

sprongsgewijze opheldering tot stand: een buisje, dat minder tankwater bevatte was soms eerder helder geworden dan een buisje met meer tankwater.

Alle contrôles bleven in deze reeks volkomen troebel.

Conclusie: Uit de proeven met doorvoeren van lucht blijkt, dat de vloeistof uit een geluchte tank sterker reinigt dan de vloeistof uit de tank, die verwaarloosd werd door haar buiten werking te stellen.

Het geluchte water bevatte dan ook een veel grooter aantal protozoën dan het ongeluchte water.

IX. Samenvatting.

Als ik mijn proeven nog eens in het kort mag samenvatten, meen ik verband te hebben gelegd tusschen het lot van pathogene darmbacteriën in de buitenwereld in het algemeen, en in een septictank in het bijzonder. Terwijl in de buitenwereld, vooral in vervuild water, het leven van pathogene darmbateriën bedreigd wordt door de aanwezigheid van protozoën, die — men mag wel zeggen — het werkzaamste aandeel hebben in de opruiming van bacteriën, mag deze belangrijke factor in een goed werkende tank uitgeschakeld worden. De afwezigheid van zuurstof in de essentieele lagen van de tank maakt het leven voor de protozoën, althans in hun vegetatieven vorm, daar onmogelijk. En tevens zullen zij de middelste laag der werkende tank, die zeer rijk is aan zwavelwaterstof, ontvluchten. Want dat protozoën in een werkende tank wel degelijk aanwezig zijn, meen ik bewezen te hebben door mijn proeven met vloeistof van de tank in verwaarloosden toestand. Zoodra de tank buiten werking gesteld of gelucht werd, kon ik opruiming van bacteriën door protozoën demonstreeren.

In dit verband wil ik wijzen op het belang van de methyleenblauw-proef, de bepaling van het zuurstofgehalte en den anaërobentiter. Deze eenvoudige proeven geven een middel in handen om ons een oordeel te vormen van den toestand, waarin een septictank op een bepaald oogenblik verkeert.

Moge dus den pathogenen darmbacteriën in een goed werkende tank geen gevaar dreigen van de kant der protozoën, de rottende vloeistof als zoodanig schijnt evenmin noodlottig te zijn voor de ziektekiemen. Want in vloeistof, afkomstig van een werkende tank nemen pathogene darmbacteriën in vrijwel

even sterke mate in aantal af als in physiologische zoutsolutie.

Maar in een septictank kan een andere factor, die zich in het algemeen in de buitenwereld niet zoo sterk zal doen gelden, de doodsoorzaak van ziektekiemen zijn: n.l. de waterstofionenconcentratie. Bij mijn proeven bereikte de vloeistof nooit een waterstofionenconcentratie hooger dan P_H 7.7. Van een dergelijke vloeistof ging geen doodende werking uit. Doch ik heb kunnen aantoonen, dat, indien de vloeistof in de tank gedurende de rijping sterk alcalisch wordt, pathogene darmbacteriën in korten tijd af kunnen sterven.

De toestand in een verwaarloosde septictank komt in vele opzichten overéén met dien in vervuild water: de snelle opruiming der bacteriën door protozoën maakt het zeer waarschijnlijk, dat pathogene darmbacteriën in korten tijd hieruit zullen verdwijnen.

Dat dit in een goed werkende tank eveneens zou geschieden, meen ik op grond van mijn proeven te moeten ontkennen.

Daar in een septictank altijd protozoën aanwezig zijn, die zich aan de oppervlakte van de drijflaag ophouden zoolang de tank goed werkt, is het mijns inziens noodzakelijk, dat in een rottingskelder tusschenschotten worden aangebracht, zooals Clemesha het voorschreef. De vloeistof en de daarin zich bevindende pathogene kiemen worden op deze wijze gedwongen aan de oppervlakte te komen, waarbij de kans bestaat, dat de ziektekiemen den protozoën ten prooi vallen. Worden de tusschenschotten weggelaten, dan blijven aanwezige pathogene kiemen in de middelste laag, waarin zij kunnen leven en met het effluent uit de tank meegevoerd worden. Maar ook al wordt een septictank ingericht met tusschenschotten, dan nog mag het effluent zonder verdere nabehandeling niet in openbaar water worden geloosd wegens het gevaar voor verspreiding van ziektekiemen, die in de tanks zijn geraakt.

X. Conclusies.

1. De scheikundige samenstelling der vloeistof van een goed werkende septictank, die uitsluitend ingericht is voor den afbraak van faeces, heeft geen doodende werking op typhusbacillen, dysenteriebacillen en choleravibrionen.

De stofwisselingsprodukten der rottingsorganismen hebben dit evenmin.

2. De alcaliniteit der vloeistof kan schadelijk op pathogene darmbacteriën werken, mits zij hooger is dan P_H 7.7.

Bij P_H 8.4 is reeds een nadeelige invloed duidelijk merkbaar. Bij mijn proeven werd deze waarde kunstmatig bereikt.

3. Er vindt in een goed werkende septictank geen reiniging door protozoën plaats; deze kunnen echter in een tank, die verwaarloosd is, hetzij door haar buiten werking te stellen, hetzij door haar te „luchten", hun invloed op pathogene darmbacteriën wèl doen gelden.

4. Bij de inrichting van een septictank verdient het aanbeveling tusschenschotten in de tank te bouwen.

5. Het effluent van septictanks moet als gevaarlijk worden beschouwd. Het dient, voordat het op openbaar water wordt toegelaten, hetzij aan een biologische, hetzij aan een chemische bewerking worden onderworpen, die ten doel heeft het effluent onschadelijk te maken.

XI. Geraadpleegde litteratuur.

Abel. R. und *Clausen. R.*, Untersuchungen über die Lebensdauer der Cholera-vibrionen in Faecaliën. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 17, 1895.

Bach. und *Sierp.*, Zur Frage der Stickstoffbildung in Abwasserkammern. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 58, 1923. Bnd. 59 1923.

Biologische reiniging van afvalwater. Beknopt overzicht van het vraagstuk der ... De Rijksproefinrichting te Tilburg en de aldaar verkregen resultaten. 1911.

Boelman. H., Vergelijkend onderzoek van indologenes en anindologenes Proteus-stammen. Acd. proefschrift, Amsterdam, 1923.

Bokorny. Th., Einige Versuche über die Abnahme des Wassers an organischer Substanz durch Algenvegetation. Arch. f. Hyg., Bnd. 14, 1892.

Buchner. H., Über den Einfluss des Lichtes auf Bakteriën und über Selbstreinigung der Flüsse. Arch. f. Hyg., Bnd. 17, 1893.

Calmette. Recherches sur l'épuration biologique et chimique des eaux d'égouts, 1908.

Centrale Gezondheidsraad. Jaarverslagen van 1904—1912.

Clemesha. W. W., Sewage disposal in the tropics. 1910.

Coombs. J. A., The mechanics of the activated sludge process. Journ. of the Inst. of San. Engin. vol. 37, part. 3, 1923.

Courmont. P., et *Rochaix. A.*, Recherches sur l'épuration bactérienne des eaux d'égouts. Rev. d'Hyg. 1922.

——, La flore bactérienne des eaux d'égouts épurées par le procédé dit des „boues activées". Compt. rend. d. Ac. Sc. T. I, 1920.

——, Action des microbes des eaux d'égouts épurées par le procédé des „boues activées". Ibid. T. I, 1920.

—— et *Laupin. F.*, Sur l'épuration bactérienne et colibacillaire au cours du traitement des eaux d'égouts par le procédé des „boues activées." Ibid. T. I, 1921.

——, Disparation des germes pathogènes au cours de l'épuration des eaux d'égouts par les „boues activées." Ibid. T. II, 1921.

Departement der Burgerlijke en Openbare werken in Ned. Indië.
Mededeelingen en Rapporten van ... Afvoer van Faecaliën in de Tropen middels rottingskelders met bodemreiniging. 1919.

Diénert. M. F., Epuration des eaux d'égout par les boues activées. Rev. d'Hyg. 1922.

——, Au sujet des boues activées. Compt. rend. d. Ac. Sc. T. II, 1921.

Dunbar. Leitfaden für die Abwasserreinigungsfrage. 1912.

Eijken. P. A. A. F., Bodemonderzoek te Soerabaja. Gen. Tijdschr. v. Ned. Ind. deel 58, 1918.

—— en *Grijns. G.,* Over biologische processen in den Indischen bodem. Gen. Tijdschr. v. Ned. Ind., deel 55, 1915. Ibid., deel 56, 1916.

Eijkman. C., De gistingsproef bij 46° C. als hulpmiddel bij het wateronderzoek. Ned. Tijdschr. v. Gen., No. 16, 1904. Ibid., No. 13, 1913.

Emmerich. R., Über die Beurteilung des Wassers vom bakteriologischen Standpunkte. Zeitschr. f. Unt. d. Nahr. u. Genussm. 1904.

Favre. W., Zur Frage der Schlammverzehrung in der Faulkammer. Ges. Ing. No. 50, 1907.

Fehrs. Die Beeinflussung der Lebensdauer von Krankheitskeimen im Wasser durch Protozoën. Hyg. Rundsch. Bnd. 16, 1906.

Flu. P. C., Over hyp- en inagglutinabele choleravibrionen en hunne beteekenis voor de praktische diagnose der cholera.
Mededeel. uit het Gen. Lab. te Welt. A. 2e serie No. 15, 1914.

——, De levensduur van choleravibrionen in en op den grond van cholerakampongs te Batavia en de bodemtheorie der cholera asiatica van Max von Pettenkofer. Ibid. A. 2e serie No. 16, 1915.

——, Epidemiologische studiën over de cholera te Batavia, 1909—1915. Ibid. A. 2e serie No. 16, 1915.

——, Onderzoekingen over zelfreiniging van water, bewaard in groote reservoirs onder toetreding van het volle zonlicht.
Mededeel. van den B. G. D., 1921.

——, Onderzoekingen over den levensduur van choleravibrionen en typhusbacteriën in septictanks te Batavia. Gen. Tijdschr. v. Ned. Ind. deel 62, 1921.

——, Onderzoekingen over den levensduur van choleravibrionen en typhusbacteriën in zeewater.
Mededeel. van den B. G. D., 1922.

Fowler. G. J., The conservation of nitrogen with special reference to activated sludge. Journ. of the Ind. Inst. of Sc. vol. 3. part. 8, 1908.

Frank. G., Die Veränderungen des Spreewassers innerhalb und unterhalb Berlin, in bakteriologischer und chemischer Hinsicht. Zeitschr. f. Hyg. Bnd. 3, 1888.

Fürbringer und *Stietzel.* Ueber die Lebensdauer von Cholera und Thyphusbacteriën in Spulgrüben. Zeitschr. f. Hyg. Bnd. 61, 1908.

Galvano. O. und *Calderini. A.,* Lebensdauer und Virulenz des Typhusbacillus im Gruben, Tonnen und im Boden. Zeitschr. f. Hyg. Bnd. 61, 1908.

Gärtner. A., Ueber das Absterben von Krankheitserreger im Mist und Compost. Zeitschr. f. Hyg. Bnd. 28, 1898.

——, Die Hygiene des Wassers, 1915.

Groenewege. J., De beteekenis der protozoën voor de biologische reiniging. Gen. Tijdschr. v. Ned. Ind. deel 57, 1917.

Groenewege. J., Bacteriologische onderzoekingen over biologische reiniging. Mededeel. uit het Gen. Lab. te Welt. A. 3e serie No. 4, 1920.

——, Biologische reiniging van afvalstoffen. Algemeen Ingen. Congres te Batavia, 1920.

Grijns. G., Over biologische processen. De rol der oxydatieprocessen. Gen. Tijdschr. v. Ned. Ind. deel 58, 1918.

Hankin. M. E., L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange. Ann. de l'Inst. Past., 1896.

Hannaford Richards. E. and *Sawayer G. C.*, Further experiments with activated sludge. Journ. of the Soc. of Chem. Ind., 1922.

Hilsum. M., Bacteriologisch onderzoek van een zwembad in verband met zelfreiniging. Acad. proefschrift, 1900.

Horrocks. W. H., On the behaviour of the bacillus typhosus in sewage. Journ. of the R. San. Inst. vol 20, part 4, 1900.

Hörhammer. Cl., Untersuchungen über das Verhalten niederer Krustazëen gegenüber Bakterien im Wasser. Arch. f. Hyg. Bnd. 73, 1911.

Huntemüller. O., Vernichtung der Bakterien im Wasser durch Protozoën. Arch. f. Hyg. Bnd. 54, 1905.

HylKema. B., Waterstofionenconcentratie van voedingsbodems. Voordracht in de verg. v. d. Ned. Ver. v. Microb. 9 Dec. 1922.

Kafibrel. G., Bakteriologische und kritische Studien über die Verunreinigung und Selbstreinigung der Flüsse. Arch. f. Hyg. Bnd. 30, 1897.

Karlinski. J., Untersuchungen über das Verhalten des Typhusbacillen in typhösen Dejectionen. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 6, 1889.

Klein. E., Ueber einen pathogenen anaëroben Darmbacillus, Bacillus enteritidis sporogenes. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 18, 1895. Ibid. Bnd. 22, 1897. Ibid. Bnd. 23, 1898. Ibid. Bnd. 29, 1899.

Kligler. I. J., Investigation on soil polution and relation of the various types of privies to the spread of intestinal infections. Monogr. of the Rockef. Inst. f. Med. Res. No. 15, 1921.

Korschun. S. W., Zur Frage der Verbreitung des Abdominaltyphus durch Trinkwasser. Arch. f. Hyg. Bnd. 61, 1907.

Langermann. Untersuchungen über den Vorgang der Selbstreinigung, ausgeführt am Wasser des Gieszenes Volksbades. Zeitschr. f. Hyg. Bnd. 64, 1909.

Levy. E. und *Kayser. H.*, Ueber die Lebensdauer von Typhusbacillen, die in Stuhle entleert werden. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 33, 1903.

Löw. O., Zur Frage der Selbstreinigung der Flüsse. Arch. f. Hyg. Bnd. 12, 1891.

Müller. P. Th., Ueber die Rolle der Protozoën bei der Selbstreinigung stehendes Wassers. Arch. f. Hyg. Bnd. 75, 1912.

Neumann und *Mosebach.* Ueber die Wirkung von Desinfektionsmitteln in gefüllten Abortgruben und die Dauer der Lebensfähigkeit von Typhusbacillen in Abortgruben. Arb. a. d. Kaiserl. Ges. Bnd. 38, 1912.

Oefiler. R., Flagellaten und Ciliatenzucht auf reinem Boden. Arch. f. Prot. k. Bnd. 40, 1919.

Ofilmüller. W., und *Spitta. O.,* Die Untersuchungen und Beurteilung des Wassers und Abwassers. 1921.

Park. W. H., Typhoïdbacilli in feces. Journ. of the Am. Med. Ass. Vol. 49. 1907.

Pettenkofer. M. von, Zur Selbstreinigung der Flüsse. Arch. f. Hyg. Bnd. 12, 1891.

Pfeiffer. L., und *Eisenlofir. L.,* Zur Frage der Selbstreinigung der Flüsse. Arch. f. Hyg. Bnd. 14, 1892.

Ringeling. H. G., Eenige opmerkingen omtrent de moderne biologische zuiverings-methode. 1900.

Rivaï. A., Over den invloed van flagellaten op de zelfreiniging van het bassin-water. Gen. bladen, 14e reeks No. 11, 1909.

Rogers. L. The influence of the septictank on pathogenetic bacteria. Br. Med. Journ. 1903.

Rolants. M. E., Rôle de la fosse septique. Rev. d'Hyg. 1911.

——, L'épuration des eaux d'égout par le procédé des boues activées. Rev. d'Hyg. 1920.

Royal Commission on sewage disposal. Interim Report, 1901. Second Report, 1902. Fifth Report, 1908.

Schepilewski. E., Ueber den Prozess der Selbstreinigung der natürlichen Wässer nach ihrer Künstlichen Infizierung durch Bakteriën. Arch. f. Hyg. Bnd. 72, 1910.

Schiller. Zur Verhalten der Erreger der Cholera und des Unterleibstyphus in dem Inhalt der Abtrittsgruben und Abwässer. Arb. a.d. Kaiserl. Ges. Bnd. 6, 1890.

Smit. J., Het „activated sludge" proces ter reiniging van afvalwater. Ned. Tijdsch. v. Gen. No. 10, 1924.

Spiegel. Ueber die Vernichtung von Bakterien im Wasser durch Protozoën und über die Fähigkeit der Bodonazëen Bakteriënfilter zu durchdringen. Arch. f. Hyg. Bnd. 80, 1913.

Stokvis. C. S., Protozoën und Selbstreinigung. Arch. f. Hyg. Bnd. 71, 1909.

Stokvis. C. S. and *Swellengrebel N. H.,* Purification of water by infusoria. Journ. of Hyg. vol 11, No. 4, 1912.

Uffelmann. J., Die Dauer der Lebensfähigkeit von Typhus und Cholerabacillen in Fäcalmassen. Centr. bl. f. Bakt. Bnd. 5, 1889.

Venema. T. H., Over reiniging van afvalwater met name over het leibedstelsel. Tijdschr. v. Soc. Gen. No. 1 en No. 2, 1917.

Young M. and *Melling S. E.,* Activated sludge in the treatment of sewage. Journ. of the R. San. Inst. vol 39, 1918.